

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA - UFSC

Centro de Ciências Físicas e Matemáticas - CFM

Curso de Pós-Graduação em Química

**ESTUDO DAS INTERAÇÕES DE ÍONS METÁLICOS
DIVALENTES
COM ÁCIDOS FÚLVICOS EXTRAÍDOS DAS ÁGUAS
DO RIO SUWANNEE**

Denise de Oliveira Vaz

Tese de Doutorado aprovada pelo Programa de Pós-Graduação em Química da UFSC, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Química.

Área de Concentração: Química Inorgânica

Orientador: Prof. Dr. Bruno Szpoganicz

Florianópolis – SC, Brasil

março, 2006

Denise de Oliveira Vaz

**ESTUDO DAS INTERAÇÕES DE ÍONS METÁLICOS BIVALENTES
COM ÁCIDOS FÚLVICOS EXTRAÍDOS DE ÁGUAS DO RIO
SUWANNEE**

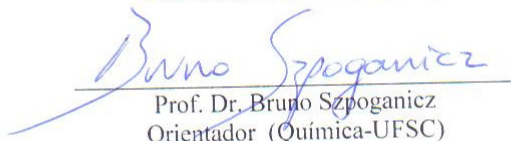
Esta tese foi julgada e aprovada para a obtenção do título de Doutora em
Química Inorgânica no Programa de Pós-Graduação em Química da
Universidade Federal de Santa Catarina .

Florianópolis, 06 de março de 2006

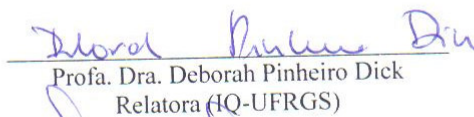


Prof. Dr. Faruk José Nome Aguilera
Coordenador do Curso

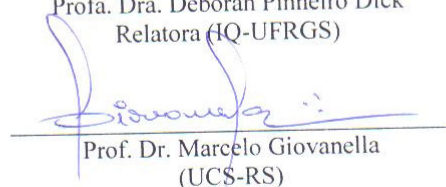
BANCA EXAMINADORA



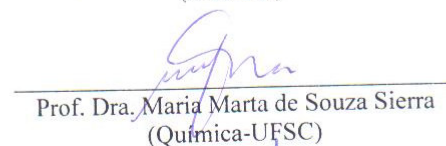
Prof. Dr. Bruno Szpoganicz
Orientador (Química-UFSC)



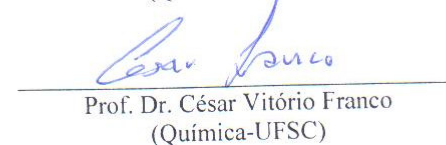
Prof. Dra. Deborah Pinheiro Dick
Relatora (IQ-UFRGS)



Prof. Dr. Marcelo Giovanella
(UCS-RS)



Prof. Dra. Maria Marta de Souza Sierra
(Química-UFSC)



Prof. Dr. César Vitório Franco
(Química-UFSC)

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Bruno Szpoganicz pela orientação e invejável criatividade e praticidade na resolução de problemas cotidianos.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento) e à FUNCITEC (Fundação de Ciência e Tecnologia de Santa Catarina) pelos recursos financeiros fornecidos para a presente pesquisa.

Aos secretários da secretaria da Pós-Graduação em Química (Graça e Jadir), pela boa vontade e bom humor na prestação dos serviços.

Aos colegas do laboratório 214, em especial, Andréia Neves Fernandes, pela sua boa vontade e rapidez em nosso trabalho em equipe.

Aos colegas dos laboratórios 311 e 313, pela companhia durante esta longa jornada, em especial ao Nicolas Isoppo e à Veronika W. Aires pela cuidadosa colaboração nos trabalhos em equipe, bem como pela amizade e cumplicidade.

Ao Prof. Dr. Nicola Senesi (*Doutor Honoris Causa* – Université de Toulouse, França), membro diretor da IUPAC e da IHSS, pela valiosa colaboração na interpretação de alguns resultados, além de enviar alguns *reprints* imprescindíveis para a conclusão deste trabalho (*grazie!*).

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	v
LISTA DE ABREVIATURAS.....	vi
RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	viii
OBJETIVOS.....	1
 Capítulo 1 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	 2
1.1.As substâncias húmicas (SH) e sua formação na natureza.....	2
1.2. Classificação das SH e sua importância para o planeta.....	4
1.3.Composição elementar, grupos funcionais e estrutura das SH.....	6
1.4.Interações das SH com íons metálicos.....	11
1.5. Aspectos toxicológicos e biodisponibilidade de íons metálicos.....	15
 Capítulo 2 – PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	 17
2.1. Materiais.....	17
2.2. Métodos.....	19
2.2.1.Titulação potenciométrica.....	19
2.2.2. Programa computacional BEST7.....	19
2.2.3. <i>Softwares</i> SPE e SPELOT.....	20
2.2.4. Método de Gran Modificado.....	20
2.2.5. Análise clássica dos grupos funcionais: método de Schnitzer e Gupta.....	24
2.2.6. Sistema operacional da titulação potenciométrica.....	25
2.2.7. Titulação do sistema modelo para SH.....	26
2.2.8. Espectroscopia de absorção molecular de luz na região do ultravioleta e visível (UV-Vis).....	27
2.2.9. Espectroscopia de absorção de luz na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	27

2.2.10. Espectroscopia de fluorescência.....	28
Capítulo 3 – RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	29
Parte A - Estudo da mistura modelo para SH	
3.1. Determinação das constantes de protonação dos grupos funcionais da mistura modelo.....	29
3.2. Medidas das quantidades molares dos grupos funcionais da mistura modelo.....	31
3.3.Complexação dos grupos funcionais da mistura modelo com íons metálicos divalentes Cu (II), Zn (II) e Cd (II).....	33
3.4.Aplicação da espectroscopia de absorção molecular de luz na região do ultravioleta e do visível (UV-Vis) na identificação de espécies de Cu (II) encontradas na potenciometria	42
Parte B – Aplicação da metodologia desenvolvida ao estudo do AFRS	
3.5. Medidas das quantidades molares dos grupos funcionais do AFRS.....	44
3.6. Determinação das constantes de protonação dos grupos funcionais do AFRS.....	47
3.7. Complexação dos grupos funcionais do AFRS com os íons divalentes cobre, cádmio e zinco.....	49
3.8. Aplicação da espectroscopia de absorção de luz na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) no estudo das interações dos íons Cu (II) e Cd (II) com o AFRS.....	56
3.9.Aplicação da espectroscopia de fluorescência ao estudo da complexação dos grupos funcionais do AFRS com os íons Cu (II), Zn (II) e Cd (II).....	64
CONCLUSÕES.....	70
TRABALHOS FUTUROS.....	71
REFERÊNCIAS.....	72

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Etapas da formação das SH na natureza.....	2
Figura 2 - Modelo do AH de solo mostrando os diversos grupos funcionais, estruturas aromáticas e alifáticas (adaptado de Schulten e Schnitzer).....	9
Figura 3 – Modelo geral de estrutura de SH, evidenciando os principais tipos de grupos funcionais	9
Figura 4 – Desenho ilustrativo da estrutura de SH em forma de “fita”, enfatizando a flexibilidade da macromolécula.....	10
Figura 5 – Desenho ilustrativo da condensação da estrutura espiral de SH ao acaso.....	11
Figura 6 - Esquema da complexação do metal Cu (II) com diferentes sítios complexantes de SH.....	14
Figura 7 - Gráfico $(V_o + V) \cdot 10^{-pH}$ versus volume de KOH (mL).....	19
Figura 8 - Gráfico $(V_o + V) \cdot 10^{-pOH}$ versus volume de KOH (mL).....	20
Figura 9 - Gráfico $\bullet pH / \bullet V$ versus Volume de KOH (mL).....	21
Figura 10 - Mapa indicando a localização do rio Suwannee no sudeste dos EUA.....	24
Figura 11 – Sistema utilizado na titulação potenciométrica.....	25
Figura 12 - Fórmulas estruturais das substâncias usadas para o sistema modelo: (A) ácido 2,4-dihidroxibenzóico, (B) ácido benzeno-1,2-dicarboxílico e (C) ácido aminoacético.....	27
Figura 13 - Curvas $p[H]$ versus a (mmol KOH/mmol de ligante), onde: (A) ácido 2,4- dihidroxibenzóico, (B) ácido benzeno-1,2-dicarboxílico, (C) ácido aminoacético, e (D) mistura dos três ácidos. concentração de cada componente = 0,05 mmol em 50 mL de solução.....	29
Figura 14 - Diagrama de distribuição de espécies da mistura modelo (% de espécies versus $p[H]$). Onde: H_3A – ácido 2,4-dihidroxibenzóico, H_2B - ácido benzeno-1,2-dicarboxílico, e H_2C - ácido aminoacético. Demais espécies aparecem desprotonadas. $\mu=0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ KCl}$, $T=25^\circ \text{ C}$, Concentração inicial de cada componente = $\sim 0,05 \text{ mmols}$ em 50 mL de solução.....	31
Figura 15 - Curvas de titulação potenciométrica: (A) mistura modelo, (B) mistura modelo com solução de Cu (II), (C) mistura modelo com solução de Zn (II), e (D) mistura modelo com solução de Cd(II), na proporção (em número de mmols) 1:1 (metal:ligante). ($\mu=0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ KCl}$, $T=25^\circ \text{ C}$, Concentração de cada componente $\sim 0,05 \text{ mmols}$ em 50 mL de solução).....	33

- Figura 16** - Percentagem de espécies formadas com o metal Cu(II) versus p[H], na razão molar 1:1 (metal:ligante). Onde: ácido 2,4-dihidroxibenzóico **(A)**, ácido benzeno-1,2-dicarboxílico **(B)** e ácido aminoacético **(C)**. Somente as espécies que contém Cu(II) foram mostradas. $\mu=0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ KCl}$, $T=25^\circ \text{C}$, Concentração de cada componente $\sim 0,05 \text{ mmols}$ em 50 mL de solução.....35
- Figura 17**- Formação de complexos CuL (1:1) e CuL_2 (1:2) de Cu(II) e aminoácido (L)...36
- Figura 18** - Representação das estruturas dos complexos formados que foram detectados no diagrama de espécies da **Figura 16**.....37
- Figura 19** - Percentagem de espécies formadas com o metal Zn (II) versus p[H], na razão molar 1:1. (metal:ligante). Onde: ácido 2,4-dihidroxibenzóico **(A)**, ácido benzeno-1,2-dicarboxílico **(B)**, e ácido aminoacético **(C)**. Somente as espécies que contém Zn (II) foram mostradas. ($\mu=0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ KCl}$, $T=25^\circ \text{C}$, Concentração de cada componente $\sim 0,05 \text{ mmols}$ em 50 mL de solução.....38
- Figura 20** - Representação das estruturas dos complexos formados com o íon Zn(II) que foram detectados no diagrama de espécies da **Figura 19**.....39
- Figura 21** - Percentagem de espécies formadas com o metal Cd(II) versus p[H], na razão molar 1:1. (metal:ligante). Onde: ácido 2,4-dihidroxibenzóico **(A)**; ácido benzeno-1,2-dicarboxílico **(B)** e ácido aminoacético **(C)**. Somente as espécies que contém Cd(II) foram mostradas. ($\mu=0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ KCl}$, $T=25^\circ \text{C}$, Concentração de cada componente $\sim 0,05 \text{ mmols}$ em 50 mL de solução).....40
- Figura 22** - Representação das estruturas dos complexos formados com o íon Cd (II) que foram detectados no diagrama de espécies da **Figura 21**.....41
- Figura 23** - Espectros de UV-Vis: **(A)** ácido benzeno-1,2-dicarboxílico; **(B)** ácido 2,4- dihidroxibenzóico; **(C)** ácido aminoacético e **(D)** da mistura modelo, sendo que todos foram titulados em presença de solução de Cu(II) $10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ 42

Figura 24 - Modelo de matriz usada para fazer os cálculos de refino das constantes potenciométricas ($\log K$) e dos valores em mmols dos grupos oxigenados do AFRS usando o software BEST7. Onde:

V_{KOH} (mL) = 50.0 0.097001 (normalidade da base KOH)
 9.82 (constante de desprotonação dos grupos fenólicos ($\log K$))
 4.56 (constante de desprotonação dos grupos benzoicos ($\log K$))
 13.0 (primeira constante de desprotonação dos grupos catecóis ($\log K$))
 22.24 (segunda constante de desprotonação dos grupos catecóis ($\log K$))
 4.92 (primeira constante de desprotonação dos grupos ftálicos ($\log K$))
 7.68 (segunda constante de desprotonação dos grupos ftálicos ($\log K$))
 13.4 (primeira constante de desprotonação dos grupos salicílicos ($\log K$))
 16.21 (segunda constante de desprotonação dos grupos salicílicos ($\log K$))
 -13.78 (constante de formação da água)
 Colunas: 0,00 3,039
 0,00 3,070

As duas colunas representam os valores de titulação: volume de agente titulante (em mL de KOH), à esquerda, e os respectivos valores de pH, à direita. Os valores foram medidos até pH 12. Os valores: -11. -6. -7. -8. -10. (são os valores das concentrações molares ($\log K$) da formação de cada espécie desprotonada).....46

Figura 25 - Diagrama de distribuição de espécies do AFRS (% de espécies *versus* $\log[H^+]$ ou $p[H]$). Onde: HA – fenol, HB – ácido benzoico, H_2C - catecol, H_2D - ácido ftálico, e H_2E - ácido salicílico, antes da perda de prótons. Demais espécies aparecem desprotonadas.
 $\mu = 0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ KCl}$, $T = 25^\circ \text{C}$, $C_{\text{AF}} = 80 \text{ mg L}^{-1}$48

Figura 26 – Em (a) e (b) tem-se a percentagem de espécies do AFRS formadas com o Cu (II) *versus* $p[H]$. Onde: grupos fenolato (A); grupos benzoato (B); grupos catecolato (C); grupos ftalato (D) e grupos salicilato (E). $\mu = 0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ KCl}$, $T = 25^\circ \text{C}$, $C_{\text{AFRS}} = 93 \text{ mg L}^{-1}$, $C_{\text{sol CuCl}_2} = 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$.
 Em (a) $V_{\text{sol CuCl}_2} = 2$, (b) $V_{\text{sol CuCl}_2} = 0,5 \text{ mL}$51

Figura 27 - Percentagem de espécies do AFRS formadas com o Zn (II) *versus* $p[H]$. Onde os grupos ligantes estão representados por fenolato (A), grupos benzoato (B), catecolato (C), ftalato (D) e salicilato (E).
 $\mu = 0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ KCl}$, $T = 25^\circ \text{C}$, $C_{\text{AFRS}} = 93 \text{ mg L}^{-1}$, $C_{\text{sol Zn(NO}_3)_2} = 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, $V_{\text{sol Zn(NO}_3)_2} = 2 \text{ mL}$53

Figura 28 – Percentagem de espécies do AFRS formadas com o Cd (II) *versus* $p[H]$. Onde os grupos ligantes estão representados por fenolato (A), grupos benzoato (B), catecolato (C), ftalato (D) e salicilato (E). $\mu = 0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ KCl}$, $T = 25^\circ \text{C}$, $C_{\text{AFRS}} = 93 \text{ mg L}^{-1}$, $C_{\text{sol CdCl}_2} = 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, $V_{\text{sol CdCl}_2} = 2 \text{ mL}$54

Figura 29 – Tipos de ligações químicas encontradas para a complexação de grupos COO- de SH com íons metálicos (a) unidentada, (b) quelato (bidentado), (c) complexo de ponte.....57

Figura 30 – Espectros de FTIR do AFRS complexado com os íons Cu (II) e Cd (II) em $p[H]$ 3,5: (a) AF (puro), (b) AF/Cu (II), (c) AF/Cd (II).....58

- Figura 31** – Espectros de FTIR do AFRS complexado com os íons Cu (II) e Cd (II) em p[H] 5,5: **(a)** AF (puro), **(b)** AF/Cu (II) e **(c)** AF/Cd (II).....59
- Figura 32** – Espectros de FTIR do AFRS complexado com os íons Cu (II) e Cd (II) em p[H] 7,0: **(a)** AF (puro), **(b)** AF/Cu (II) e **(c)** AF/Cd (II).....60
- Figura 33** – Espectros de FTIR do AFRS complexado com os íons Cu (II) e Cd (II) em p[H] 10,0: **(a)** AF (puro), **(b)** AF/Cu (II) e **(c)** AF/Cd (II).....61
- Figura 34** – Espectro de emissão de fluorescência do AFSR (20 mg L⁻¹) em 4 p[H] diferentes ($\lambda_{\text{ex}} = 313 \text{ nm}$). Em **(a)** AFSR, **(b)** AFSR + Cu(II) 0,005 mmols, **(c)** AFSR + Zn (II) 0,005 mmols, **(d)** AFSR + Cd (II) 0,005 mmols.....64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição elementar média de resíduos animais e vegetais presentes no solo.....	3
Tabela 2 – Definições usadas na química do húmus.....	4
Tabela 3 – Propriedades gerais das SH e sua importância para o solo.....	6
Tabela 4 – Composição elementar média de AH e AF extraídos de solos solos (de origem pedogênica)	7
Tabela 5 - Composição elementar (%) de SH extraídas de águas naturais.....	7
Tabela 6 - Concentrações de SH extraídas de águas naturais.....	8
Tabela 7 - Constantes de protonação obtidas para a mistura modelo (valores da literatura entre parênteses). Onde: (A) ácido 2,4-dihidroxibenzóico; (B) ácido benzeno-1,2-dicarboxílico e (C) ácido aminoacético. L (representa=A, B e C). As titulações foram feitas em triplicata.....	30
Tabela 8 - Valores das quantidades dos grupos funcionais oxigenados (meq g^{-1}) da mistura modelo calculados pelo método de Gran e por BEST7. Abaixo encontram-se os valores teóricos.....	32
Tabela 9 - Constantes de equilíbrio ($\log K$) para complexos de Cu(II), Zn(II) e Cd(II) com: (A) ácido 2,4-dihidroxibenzóico, (B) ácido benzeno-1,2-dicarboxílico, e (C) ácido aminoacético. L (representa = A, B e C). (valores da literatura entre parênteses). OBS: O símbolo (-) indica que os valores não existem na literatura.....	34
Tabela 10 - Espécies químicas encontradas durante a titulação potenciométrica da mistura modelo com os íons Cu (II), em 5 pHs diferentes e respectivos comprimentos de onda (nm) encontrados na espectroscopia de UV-visível. Valores da literatura entre parênteses.....	43
Tabela 11 - Valores das quantidades dos grupos funcionais oxigenados (meq g^{-1}) do AFRS calculados, neste trabalho, pelo Método de Schnitzer e Gupta (AFRS em C = 93 mg L^{-1}), e comparação com outros valores da literatura (em LEENHEER et al. 1995, e referências que constam no mesmo. OBS: Nas referências do artigo citado não constam os valores de desvio padrão das médias) *.....	44
Tabela 12 – Valores das espécies oxigenadas (meq g^{-1}) do AFRS, divididas em 5 classes, calculados pelo método BEST7.....	45
Tabela 13 - Constantes de desprotonação ($\log K$) para os grupos funcionais: fenól (A) , benzóico (B) , catecol (C) , ftálico (D) e salicílico (E) . Onde: L (representa = A, B, C, D e E). Valores da literatura entre parênteses.....	47
Tabela 14 – Constantes de equilíbrio ($\log K$) para os íons Cu(II), Cd(II) e Zn(II) e os ligantes fenol (A) , benzóico (B) , catecol (C) , ftálico (D) e salicílico (E) do AFRS. Onde: L (representa = A,B,C,D and E). Os valores da literatura estão listados entre parênteses. OBS: O símbolo (-) significa que os respectivos valores não foram observados experimentalmente e (*) valores não publicados.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS

SH – substâncias húmicas

AF – ácido fúlvico

AH – ácido húmico

IHSS – Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas

AFRS – ácido fúlvico do rio Suwannee

pH – potencial hidrogeniônico

FTIR – espectroscopia de absorção de luz na região do infravermelho com transformada de Fourier

UV-Vis – espectroscopia de absorção molecular de luz na região do ultravioleta e visível

RESUMO

As substâncias húmicas (SH) controlam as trocas de íons entre: solo, água, animais e plantas, por isso o estudo das interações de íons metálicos e SH tem sido de grande importância nas últimas décadas. Na primeira parte desta pesquisa, três ácidos orgânicos foram selecionados para simulação de SH e suas interações com íons metálicos divalentes (Cu (II), Zn (II) e Cd (II)). As quantidades dos grupos carboxílicos e fenólicos foram determinadas por potenciometria com o auxílio do programa computacional BEST7 e comparadas com os valores de suas massas. Os resultados foram também interpretados usando o método de Gran modificado. Os valores obtidos com o programa BEST7 foram mais próximos aos valores das massas do que aqueles obtidos usando o método de Gran modificado. As constantes de protonação para os grupos funcionais e as constantes de complexação na presença de íons divalentes foram determinadas usando potenciometria. Os resultados foram interpretados usando o programa BEST7 e estiveram de acordo com os valores da literatura. Também foi usada a espectroscopia de absorção molecular na região do ultravioleta e visível para caracterizar as espécies formadas com o Cu (II) e a mistura modelo. Na segunda parte deste estudo, a mesma metodologia foi usada para determinar a quantidade de grupos complexantes presentes no ácido fúlvico do rio Suwannee (AFRS). As quantidades (mmols) dos grupos fenólicos e carboxílicos foram determinadas pelo método de Schnitzer e Gupta. Os valores (mmols) dos 5 grupos oxigenados do AFRS (fenólicos, benzóicos, catecóis, ftálicos e salicílicos), foram então determinados, usando potenciometria com o auxílio do programa BEST7. Os valores das constantes de dissociação de prótons e de complexação com os íons divalentes para cada grupo funcional foram calculados e seus valores foram muito próximos aos valores previamente publicados. O grupo funcional presente em maior quantidade nos complexos foi o catecol, e complexou com todos os íons divalentes, e em maior quantidade com o Cu (II). De acordo com os resultados obtidos por potenciometria, a série de reatividade para os íons divalentes e o AFRS é: Cu (II) >> Cd (II) > Zn (II). Os resultados obtidos por potenciometria com os programas BEST7 para o AFRS e os íons divalentes foram confirmados pelas técnicas de FTIR e espectroscopia de fluorescência.

ABSTRACT

The humic substances (HS) control the ionic exchange between: soil, water, animals and plants, for this reason the study of metal ions and humic substances (HS) has been of great importance in recent decades. In the first part of this research, three organic acids were selected for HS simulation and their interactions with divalent metal ions (Cu (II), Zn (II) and Cd (II)). The quantities of carboxylic and phenolic groups were determined by potentiometry with the aid of the BEST7 computational program and compared with the values calculated from the weights. The results were also interpreted using the modified Gran's method. The values obtained with the BEST7 program were closer to the weight values than to those obtained using modified Gran's method. The protonation constants for the functional groups and the complexation constants in the presence of the divalent ions were determined using potentiometry. The results were interpreted using the BEST7 program and found to be in agreement with values reported in the literature. Molecular absorption spectroscopy in the ultraviolet and visible region was used to characterize the Cu (II) species formed. In the second part of this study, the same methodology was used to determine the amount of complexing groups present in Suwannee river fulvic acid (AFRS). The quantities (mmols) of the phenolic and carboxylic groups were also determined by the Schnitzer and Gupta method. The values (mmols) for the five oxygenated groups of the AFRS (phenol, carboxylic, cathecol, phthalic and salicylic), were then determined, using potentiometry with the aid of the BEST7 program. The values of the proton dissociation and complexation constants with the divalent ions for each functional group were calculated and their values were very close to those previously published. The functional group present in the highest quantity in the complexes was cathecol, and it complexed with all the divalent ions, although to a greater extent with Cu (II). According to the results obtained by potentiometry, the reactivity series for the divalent ions and the AFRS is: Cu (II) >> Cd (II) > Zn (II). The results obtained through potentiometry and the BEST7 program for the AFRS and the divalent ions were confirmed by FTIR and fluorescence spectroscopy techniques.

OBJETIVOS GERAIS

- Elaborar uma metodologia para estudar uma mistura modelo que contivesse os principais grupos funcionais (doadores) de SH de qualquer origem (terrestre, marinha ou de água doce).
- Aplicar a metodologia produzida à uma SH conhecida internacionalmente.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Medir as quantidades molares de grupos doadores de uma mistura de ligantes simples (mistura modelo para SH), cuidadosamente escolhida (constantes de equilíbrio publicadas), e determinar experimentalmente os valores médios das suas constantes potenciométricas, comparando os resultados com valores da literatura;
- Medir as quantidades molares dos grupos doadores constituintes do ácido fúlvico do rio Suwannee (AFRS) e determinar os valores médios das constantes potenciométricas dos seus grupos doadores, comparando com os valores da literatura para substâncias simples (fenol, ácido benzóico, catecol, ácido ftálico e ácido salicílico);
- Caracterizar os equilíbrios de complexação dos íons Cu(II), Zn(II) e Cd(II), com os ligantes simples (mistura modelo para SH), nas proporções (razões molares) 1:1 e 1:2, metal : ligante;
- Montar e testar uma metodologia para estudar a complexação dos grupos doadores de SH de qualquer origem com os íons Cu(II), Zn(II) e Cd(II), usando o AFRS, para testar esta metodologia. Calcular a especiação dos íons metálicos livres e coordenados com esses ligantes naturais.

Capítulo 1 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. As substâncias húmicas (SH) e sua formação na natureza

A fotossíntese dá origem a diversas substâncias orgânicas que, por sua vez dão origem à matéria orgânica de solos, sedimentos e águas naturais. Essas substâncias se dividem em dois grupos: as substâncias do primeiro são oriundas da decomposição de resíduos orgânicos de origem vegetal e animal, formando substâncias, tais como aminoácidos, proteínas, lipídeos, ligninas, etc. São denominadas *não-húmicas* e constituem cerca de 20% do carbono orgânico encontrado na natureza ¹. As substâncias do segundo grupo são resultantes de inúmeras reações enzimáticas das substâncias *não-húmicas*, dando origem, portanto, a macromoléculas de elevado peso molecular e com grupos funcionais mistos, sendo denominadas de *substâncias húmicas* (SH). As SH compõem a maior parte da matéria orgânica presente nas águas naturais, sedimentos e solos¹.

Na **Figura 1** vê-se um esquema genérico da formação das SH ².

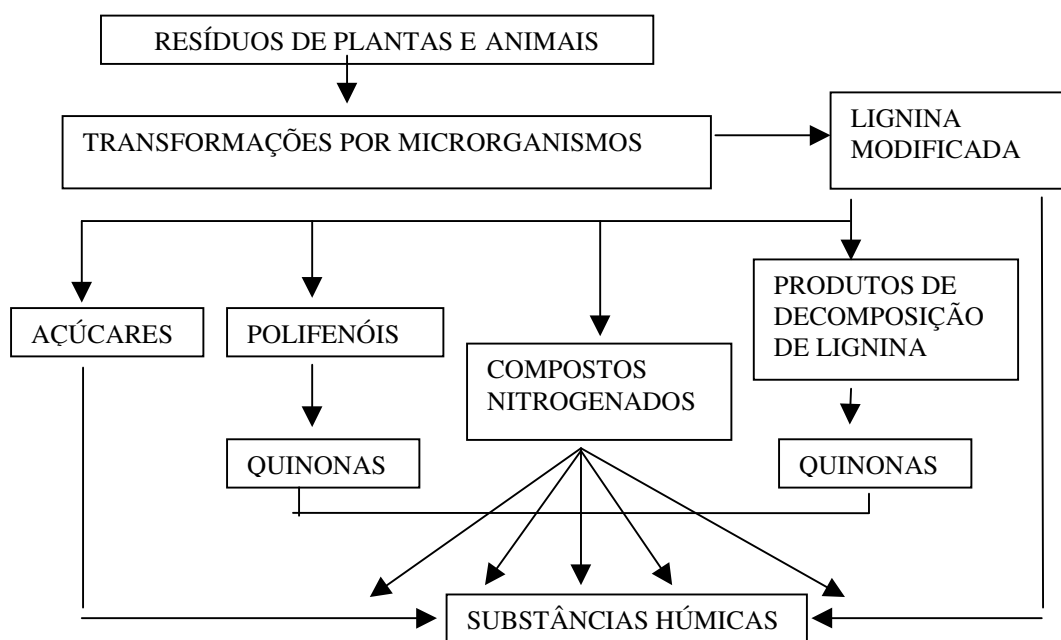


Figura 1 - Etapas da formação das SH na natureza ².

O esquema da **Figura 1**, a princípio, apresenta-se simples, porém, não se sabe o número de reações envolvidas até a formação das SH, e acredita-se que este número varie de um ecossistema para o outro. Também não se sabe, o

tempo exato para que se formem as SH. Nesse imenso “laboratório” da natureza participam, para desencadear o processo de humificação desde microrganismos até insetos e outros animais, e essas reações estão ocorrendo continuamente. O conjunto de reações pode ser dividido em duas etapas básicas: a biodegradação microbiana, que envolve a perda de açúcares e proteínas prontamente decomponíveis, e a segunda fase seria a liberação de gás carbônico ³. Na **Tabela 1** observa-se os valores da composição elementar média de resíduos de animais e vegetais do solo, que é o que dá origem às SH.

Tabela 1 – Composição elementar média de resíduos animais e vegetais presentes no solo ⁴.

Resíduos	Composição química elementar (%)			
	carbono	nitrogênio	fósforo	enxofre
bactérias	50	15	3,2	1,1
actinomicetos	50	11	1,5	0,4
fungos	44	3,4	0,6	0,4
oligoguetas	46	10	0,9	0,8
esterco	37	2,8	0,5	0,7

Como se pode ver na **Tabela 1**, o carbono é o elemento predominante, chegando até a 50%, enquanto que o nitrogênio varia de 2,8% à 15%. Os elementos fósforo e enxofre raramente ultrapassam 1%. Restos de animais e vegetais geram a maior parte do nitrogênio orgânico do solo. A decomposição de seres vivos ainda libera monossacarídeos, aminoácidos, peptídeos, clorofila, pigmentos, resinas, terpenos, alcalóides e taninos. A humificação e a mineralização se desenvolvem sob ação de enzimas específicas, tais como a urease, a catalase e a fosfatase, que são encontradas em quase todos os tipos de solos. As enzimas polissacaridases são muito importantes, devido ao fato de decomporem os polissacarídeos que são os compostos mais abundantes do solo. A urease também é muito importante porque degrada a uréia, produzindo amônia e ácido carbônico. Os aminoácidos são degradados pelas enzimas proteolíticas. A decomposição dos constituintes de origem vegetal segue a seguinte ordem

crescente de dificuldade: açúcares > hemicelulose > celulose > lignina > graxas > fenóis. As turfas são formadas, principalmente, por ligninas. As ligninas por serem tão complexas, exigem enzimas específicas para sua decomposição e microorganismos diversificados para decompor os compostos aromáticos que são liberados ⁵.

1.2. Classificação das SH e sua importância para o planeta

A seguir, na **Tabela 2**, estão relacionados os diversos tipos de SH.

Tabela 2 – Definições usadas na química do húmus ⁶.

Termos	Definições
SH/material húmico/húmus	Substâncias de cor escura, alta peso molecular, estrutura complexa e indefinida. Resultantes da decomposição de vegetais e animais.
Substâncias não húmicas	Substâncias presentes no solo, com baixo peso molecular, de composição e estrutura definida, como aminoácidos, carboidratos, ceras, lipídeos, resinas, ácidos graxos, etc.
Humina	Parte do material orgânico presente no solo, de cor escura, insolúvel em bases e ácidos.
AF	Material colorido remanescente, após separação dos AH por precipitação em meio ácido.
AH	Material orgânico de cor escura. Pode ser extraído do solo por vários reagentes e é insolúvel em meio ácido (pH < 2).

A importância das SH para a agricultura e as ciências dos solos vem sendo discutida há cerca de três séculos. No início do século XIX, Saussure ⁷ criou a palavra *humus* (do latim “solo”) para designar a matéria orgânica de cor escura vinda do solo. Saussure ⁷ observou que o *humus* era oriundo de resíduos de vegetais, possuindo grande quantidade de carbono, e pouca quantidade de hidrogênio e oxigênio. Sprengel ⁷ (entre 1826 e 1837) realizou os primeiros estudos para compreender a origem e composição química das SH. Observou que solos mais alcalinos apresentavam maior quantidade de AH, tornando-os mais férteis. Müllder ⁷ e contemporâneos acreditavam que diferentes frações húmicas eram compostos quimicamente individuais e que não possuíam nitrogênio. Ao final do século XIX, surgiram inúmeros trabalhos visando a

classificação das frações húmicas. O interesse no estudo das SH aquáticas aumentou somente nos últimos 30 anos, apesar dos pesquisadores virem a estudar SH do solo há três séculos. Isso se deve ao fato do começo da conscientização da importância da qualidade química da água para consumo humano ⁸. De quase toda a água que existe no planeta Terra, menos de 1% dela está disponível para os seres humanos, na forma de rios, lagos, lençóis freáticos e chuva, sendo que sua disposição é bastante irregular no planeta (cerca de 1,5 bilhão de pessoas não têm acesso regular à água). Há também a redistribuição das chuvas, provocadas pelos desmatamentos e outras agressões do homem, bem como a desproporção entre a nossa capacidade poluidora e o controle que temos sobre a poluição ⁹. As SH presentes nas águas, atuam como agentes despoluidores naturais. Isso ocorre devido ao fato de que as mesmas possuem grupos funcionais que complexam poluentes metálicos e radionuclídeos (incluindo elementos da série dos transurânicos e também composto antropogênicos orgânicos). Porém, halogênios podem interagir com as SH durante o tratamento de águas (com o Cl_2) e produzir carcinogênicos halogenados (trialometanos) tal como o clorofórmio, os quais são introduzidos diretamente nas águas para consumo com riscos à saúde, como possível câncer de bexiga, cólon, etc. Tem sido mostrado que amostras pré-tratadas com ClO_2 apresentam uma redução de 50% de trialometanos formados, quando comparadas às amostras não pré-tratadas com ClO_2 ¹⁰. As SH atuam como se fossem “agentes tamponantes” podendo ser protonadas e desprotonadas, segundo o pH dos ecossistemas. As SH são muito importantes para a agricultura, pois devido à sua cor escura possuem características refratárias, aumentando o poder de retenção de calor no solo, funcionando como uma espécie de “estufa natural” para a germinação de sementes. Também ajudam a evitar a erosão do solo e contribuem para a sua permeabilidade, pois retém água e interagem com argilo-minerais, cimentando as partículas do solo ¹¹⁻¹³. As SH são os principais constituintes da matéria orgânica do solo, também regulando em um grande número de situações a complexação de metais no mesmo. Uma das mais importantes propriedades das SH é a capacidade de interagir com íons metálicos para formar complexos de diferentes estabilidades e características estruturais ¹⁴. É importante tentar elucidar as estruturas e o comportamento físico-químico de tais substâncias com os poluentes, porque isso poderá ajudar no controle da poluição, ou seja,

conhecendo o comportamento das SH pode-se produzi-las em laboratório. A **Tabela 3** apresenta as propriedades gerais das SH e a sua importância para o solo.

Tabela 3 – Propriedades gerais das SH e sua importância para o solo ¹⁵.

Propriedades	Observações	Efeitos no solo
Cor	A cor escura de muitos solos é causada pelas SH	Retenção de calor, auxílio na germinação de sementes
Retenção de água	Podem reter água até 20 vezes sua massa	Evitam a erosão e matém a umidade do solo
Combinação com argilominerais	Cimentam partículas do solo formando agregados	Permitem a troca de gases e aumentam a permeabilidade do solo
Quelação	Formam complexos estáveis com Cu^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} e outros cátions	Melhoram a disponibilidade de nutrientes para as plantas maiores
Insolubilidade em água	Devido a sua associação com argilas e sais de cátions di e trivalentes	Pouca matéria orgânica é lixiviada
Ação tampão	Tem função tamponante em amplos intervalos de pH	Ajudam a manter as condições reacionais do solo.
Troca de cátions	A acidez total das frações isoladas do húmus varia de 300 a 1.400 cmoles kg^{-1}	Aumentam a concentração total de carbono no solo de 20 a 70% da de solos se deve à matéria orgânica.
Mineralização	A decomposição da matéria orgânica fornece CO_2 , NH_4^+ , NO_3^- , PO_4^{-3} e SO_4^{-2} .	Fornecimento de nutrientes para o crescimento das plantas

1.3. Composição elementar, grupos funcionais e estrutura das SH

A composição elementar das SH sofre certa variação de um ecossistema para outro. Basicamente são formadas pelos elementos carbono, oxigênio, hidrogênio, nitrogênio, enxofre e fósforo sendo que o carbono e o oxigênio aparecem em maior quantidade ¹⁶. Em geral, os AH possuem maior quantidade de carbono do que os AF, e os AF possuem maior quantidade de oxigênio. O oxigênio aparece na sua maioria, em forma de hidroxilas fenólicas e carboxilas, e em minoria, na forma de grupos como álcoois, ésteres e éteres. Grupos

funcionais contendo nitrogênio, enxofre ou fósforo, podem aparecer dependendo da fonte de matéria orgânica que deu origem à SH.

Tabela 4 - Composição elementar média de AH e AF extraídos de solos (de origem pedogênica) ¹⁶.

SH	Composição elementar média (%)				
	Carbono (C)	Hidrogênio (H)	Oxigênio (O)	Nitrogênio (N)	Enxofre (S)
AH	53,8-58,7	3,2-6,2	32,8-38,3	0,8-4,3	0,1-1,5
AF	40,7-50,6	3,8-7,0	39,7-49,8	0,9-3,3	0,1-3,6

Observa-se na **Tabela 4** que os AH têm maior teor de carbono e menor teor de oxigênio em relação ao AF. Em geral, AH possuem uma quantidade um pouco maior de nitrogênio do que AF. A razão C/H indica o grau de aromaticidade em SH e é maior para os AH. Os AF possuem mais grupos funcionais de natureza ácida (carboxila, em geral). A acidez total dos AF (9 a 14 mol Kg⁻¹) é, em geral, mais elevada do que a dos AH (de 4 a 8,7 mol Kg⁻¹), variando bastante conforme o ecossistema e também com o método de extração ^{17,18}.

Na **Tabela 5** estão registrados alguns valores de composição elementar em percentual de AF e AH extraídos de águas naturais.

Tabela 5 - Composição elementar (%) de SH extraídas de águas naturais ¹⁹.

Amostra	carbono (C)	hidrogênio (H)	oxigênio (O)	nitrogênio (N)	enxofre (S)	fósforo (P)	Total	Cinzas
AF aquáticos	55	5	36	1	2	0,34	100	0,38
AH aquáticos	54	4	33	2	1	0,06	98	1,49

Como se pode observar na **Tabela 5**, os AF extraídos de águas naturais possuem maior quantidade de oxigênio do que os AH (assim como ocorreu com amostras de AF extraídas de solos). Porém, os AF extraídos de águas naturais possuem maior quantidade de carbono, em relação aos AH, ocorrendo o contrário com os AF extraídos de solo, que demonstraram menor quantidade de C do que

os AH. O conteúdo de N, em geral, para AH é maior do que para AF, seja em amostras extraídas de solos ou de águas. Na **Tabela 6** são apresentados os valores das concentrações de SH extraídas de águas naturais.

Tabela 6 - Concentrações de SH extraídas de águas naturais ²⁰.

Amostras	Concentração de SH estimada (mg L ⁻¹)
Águas superficiais	Os valores variam muito, foram encontrados valores de 7 à 30
Águas subterrâneas	20
Águas marinhas	$2,9 \cdot 10^{-3}$

Devido ao fato da concentração das SH ser tão pequena em águas naturais, a extração versus a avaliação da sua concentração são etapas fundamentais para os estudos relacionados com as suas propriedades. São requeridos grandes volumes de amostra de água para extrair quantidades satisfatórias de material húmico, devido à baixa concentração das SH em águas naturais ²⁰. Há algumas décadas, muitos pesquisadores acreditavam que as SH eram formadas basicamente por estruturas aromáticas, porém com o avanço da tecnologia no estudo das SH, com o uso da espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN), observou-se que o grau de aromaticidade é muito menor do que o esperado ²¹. Em vista disso, Schulten e Schnitzer ²² propuseram um modelo de estrutura de AH, incorporando grandes porções alifáticas (**Figura 2**).

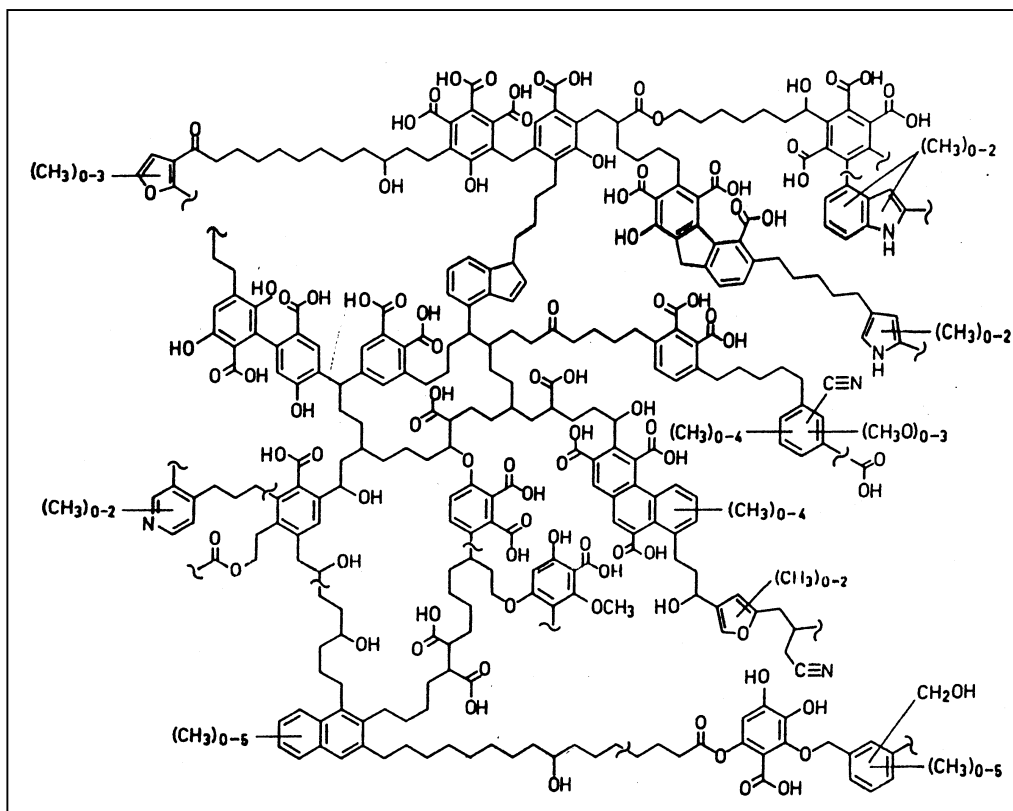


Figura 2 - Modelo do AH de solo mostrando os diversos grupos funcionais, estruturas aromáticas e alifáticas (adaptado de Schulten e Schnitzer)²².

Na **Figura 3** é apresentada um modelo de estrutura de SH, evidenciando os principais grupos funcionais usualmente disponíveis em SH.

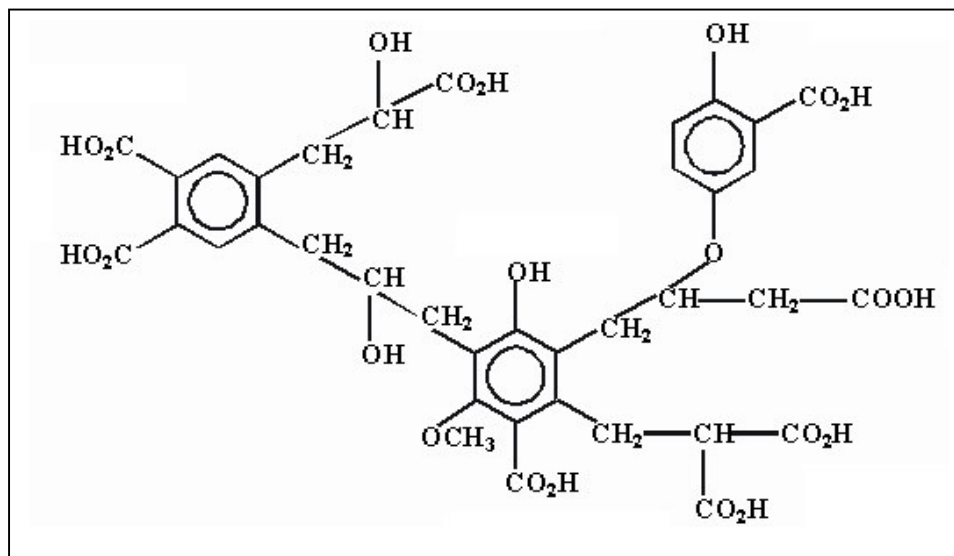


Figura 3 – Modelo geral de estrutura de SH, evidenciando os principais tipos de grupos funcionais²³.

Diversos fatores influem na composição química das SH, tais como tipo de solo, clima e vegetação ²⁴. Em geral, amostras de SH de ecossistemas marinhos possuem maior quantidade de grupos alifáticos, enquanto que SH de origem terrestre possuem maior quantidade de grupos fenólicos (ligninas). SH de ambientes marinhos possuem alto grau de conteúdo alifático que é atribuído à decomposição de algas que geram lipídios, que conferem maior quantidade de grupos carboxila às SH de origem marinha. As SH de origem terrestre são originadas da decomposição de vegetais que liberam ligninas, propiciando maior quantidade de grupos fenólicos (maior aromaticidade). Esses grupos funcionais carboxila e hidroxilas fenólicas (ricos em oxigênio) conferem às SH, as habilidades de formarem complexos estáveis com íons metálicos ²⁴. Como se pode observar nas **Figuras 2 e 3**, os modelos consistem de esqueleto de “C” (na maioria, aromático), contendo ramificações alifáticas. O oxigênio aparece preferencialmente em forma de hidroxilas fenólicas e grupos carboxílicos. A conformação estrutural de algumas macromoléculas húmicas pode ser representada por aproximações em forma de espiral ou elipsoidal, sendo esta última a mais freqüente. A espiral é representada como se fosse uma “fita” contendo grupos polares e cargas negativas ao longo de sua extensão. A estrutura elipsoidal tem a característica de uma esfera, com distribuição gaussiana de massa molar com alta densidade de massa no centro e decresce em direção à extremidade da esfera. A dimensão da esfera depende da extensão da “fita”, da densidade de carga, da solvatação, da ionização dos grupos ácidos, da concentração de sais em solução, das ramificações e das ligações cruzadas ²⁵.

Nas **Figuras 4 e 5** observa-se duas conformações: espiral e esférica, respectivamente ²⁵.

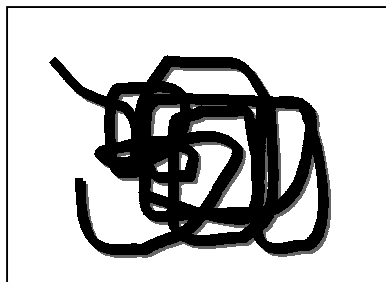


Figura 4 – Desenho ilustrativo da estrutura de SH em forma de “fita”, enfatizando a flexibilidade da macromolécula ²⁵.

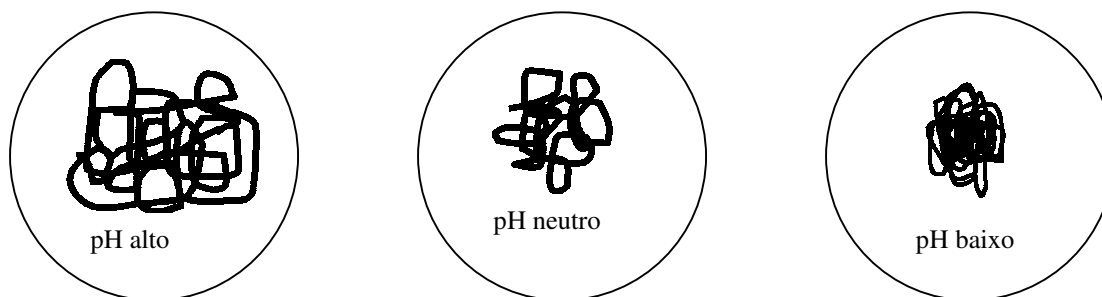


Figura 5 – Desenho ilustrativo da condensação da estrutura espiral de SH ao acaso ²⁵.

A estrutura das SH é modulada por fatores, tais como pH, força iônica, concentração em solução, entre outros. Por exemplo, AH podem apresentar estrutura globular em pHs menores e mais plana em pH mais altos. Isto ocorre devido ao fato de que em sítios desprotonados (em pH mais altos) há aumento de densidade de carga, ocorrendo repulsão, tornando, assim, a estrutura mais aberta ²⁶. Tem sido proposto que SH dissolvidas formam, em determinadas condições de pH e força iônica, regiões semelhantes a micelas de detergentes em soluções aquosas. Assim como no caso dos detergentes, estas “pseudomicelas” teriam um interior hidrofóbico ²⁷. Em 2000, Piccolo ^{28,29} sugeriu que as SH não possuiriam estrutura extremamente complexa, mas seriam formadas pela agregação de pequenas moléculas (“building blocks”). Até hoje, se conhece pouco a respeito da estrutura das SH, enquanto se aguarda avanços na área da espectroscopia. Estes avanços irão propiciar, certamente, maiores descobertas acerca das SH.

1.4. Interações das SH com íons metálicos

Uma das mais importantes propriedades das SH é a capacidade de interagir com íons metálicos para formar complexos de diferentes estabilidades e características estruturais ³⁰. A complexação das SH com determinados metais é de grande interesse em estudos ambientais, pois o processo de transporte, ciclo hidroggeoquímico e biodisponibilidade de metais em águas naturais e em solos, freqüentemente dependem da natureza e da estabilidade termodinâmica dos complexos SH *versus* metais formados como espécies de metais disponíveis ou inertes ³¹. Tem sido observado por espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica ³² que muitos metais complexam com carboxilas, mas o Cu (II) parece ter preferência em se ligar a certas quantidades de grupos que contém “N”, não

bem caracterizados ainda. Várias técnicas têm sido usadas para o estudo da interação de metais com SH, tais como potenciometria ³³, fluorescência de multiresposta ³⁴, espectroscopia de fluorescência de raios-X por reflexão total ³⁵, entre outras. Sargentini *et al.* ³⁶ efetuaram estudos da labilidade relativa de espécies metálicas divalentes (Ni, Cu, Zn, Cd e Pb) complexadas com SH aquáticas, utilizando espectroscopia de emissão atômica com plasma de argônio induzido (ICP-AES) e observaram que há diminuição da labilidade em função do tempo. Eles formularam a hipótese de que isso pode ser explicado assumindo-se que, quando em contato com as SH, inicialmente, os íons metálicos são complexados preferencialmente por sítios de complexação mais externos, ou seja, mais disponíveis. Com o passar do tempo, os complexos metal-SH tendem a se estabilizar, surgindo arranjos inter e/ou intramoleculares, com transferência de metal para sítios de complexação mais internos. Desta forma, a espécie metal-SH tem sua labilidade relativa reduzida ao longo do tempo, e o íon metálico fica menos disponível para participar de reações no ambiente aquático. As SH possuem diversos tipos de sítios de complexação, sendo que cada sítio (grupo funcional) pode complexar íons específicos. Os grupos carboxílicos, por exemplo, que possuem átomos “duros” como o oxigênio interagem de preferência com íons metálicos “duros”, tais como Ca(II), Mg(II), Fe(III) e Al(III), enquanto sítios com átomos “moles” tais como o enxofre ou nitrogênio, ligam-se a íons “moles” tais como o Cu(I), Fe(II) e Au(I) ³³. De acordo com Martell ³⁷, um ácido “duro” é uma classe de íons metálicos que tende a formar complexos com ligações iônicas, tendo pequeno caráter covalente (metais da coluna 1A e 2A da Tabela Periódica, por exemplo). Em contrapartida, ácidos “moles” são íons com tendência a formar ligações mais covalentes (metais nobres, como o Au(I), Pt(II) e Ag(I), por exemplo) ou mesmo o Cd(II), Cu(I) e o Hg(II). Como exemplo de bases “duras”, têm-se os ânions, tais como fluoreto, óxido, cloreto, etc, que formariam fortes ligações iônicas com os ácidos “duros”. As bases “moles” são ligantes que tendem a formar fortes ligações covalentes com os ácidos “moles”, e consistem de ligantes neutros com baixa carga negativa e alta polaridade, como por exemplo piridina e ânions, no qual a carga negativa é distribuída sobre um número de átomos através da existência de formas apropriadas de ressonância. Quanto maior a polaridade da molécula, mais “duro” será o ligante. Stevenson ³⁸ sugere que, devido à natureza heterogênea das SH, a complexação de elementos traços

pode ocorrer de diversas maneiras, desde fracas forças de atração até ligações altamente estáveis ³⁸. Conforme pode ser visto no esquema da **Figura 6**, a ligação do Cu(II) pode ocorrer através de ligação com a água (**A**), atração eletrostática a um grupo COO⁻ carregado (**B**); formação de ligações coordenadas com um grupo doador simples (**C**), e formação de uma estrutura quelato (anel), tal como uma combinação de um sítio COO⁻ e de um OH fenólico (**D**). A ligação de um metal traço poderia ocorrer preferencialmente nesses sítios que formam complexos mais fortes, como por exemplo, formação de ligações coordenadas e estruturas de anel. Assim, estruturas do tipo (**C**) e (**D**) representam as formas predominantes dos complexos dos elementos traços quando SH estão presentes. A maioria dos pesquisadores enfatiza a hipótese de ocorrer a ligação do tipo anel quelato (**D**), mas como visto anteriormente, elas não podem ser consideradas únicas.

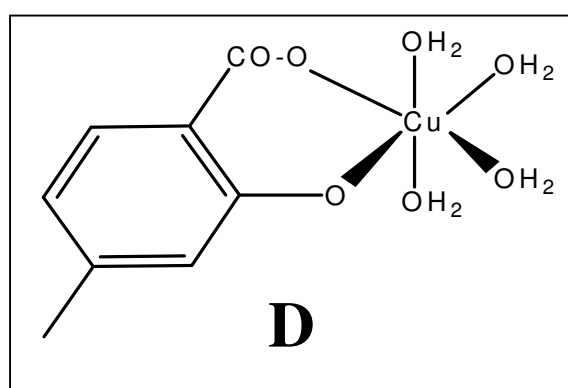
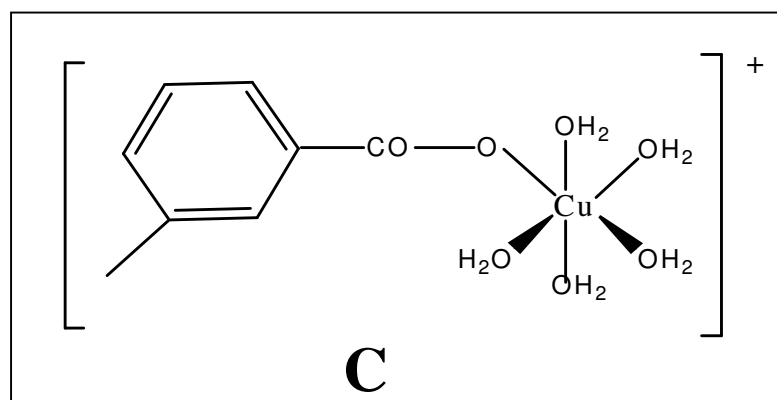
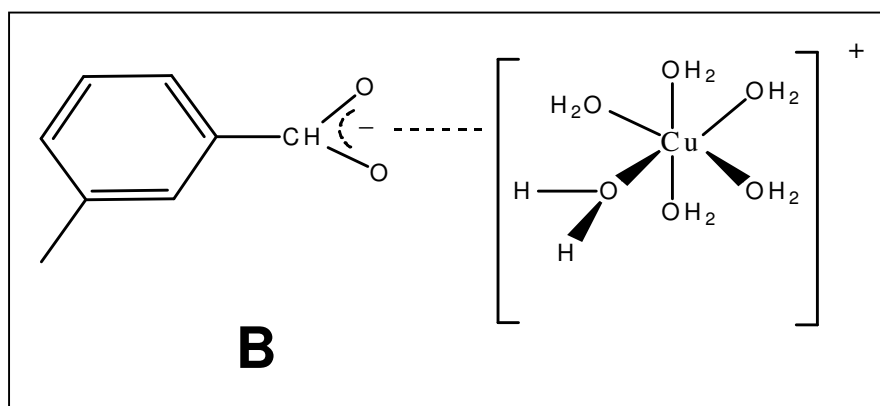
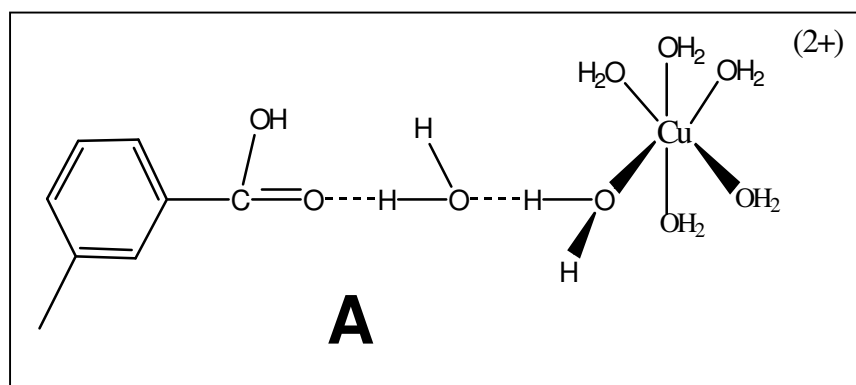


Figura 6 - Esquema da complexação do metal Cu (II) com diferentes sítios complexantes de SH ³⁸.

1.5. Aspectos toxicológicos e biodisponibilidade de íons metálicos

A biodisponibilidade é a forma em que se encontra um íon metálico que é capturado por um organismo vivo e depende da concentração em que se encontra na amostra à qual está ligado. Os metais Hg, Cd, Pb e As são altamente tóxicos e se acumulam no organismo dos seres vivos. Alguns metais como Fe, Mn, Cu, Zn, Mo e Co são essenciais para o ciclo vital dos organismos, porém também se tornam tóxicos quando suas concentrações superam as necessidades de uma dieta nutricional correta ³⁹. O cobre está presente em muitas enzimas, sendo envolvido em processos metabólicos que dependem de reações redox, mas se ingerido em doses altas pode provocar irritação e corrosão das mucosas, danos capilares generalizados, problemas hepáticos, renais e irritação do sistema nervoso central, seguido de depressão. Em altas concentrações, é altamente tóxico para muitos organismos em ecossistemas aquáticos. O cobre é um dos metais mais tóxicos, seguido do Hg e da Ag no fitoplâncton marinho ³⁹. Lorenzo *et al* ⁴⁰ observaram uma nítida diminuição na toxicidade do Cu (II) em presença de SH em ambientes marinhos. Uma concentração de AH de 3,2 mg L⁻¹ foi suficiente para reduzir a embriotoxicidade na larva *Paracentrotus lividus*, em águas marinhas, de 60 µg de Cu(II) L⁻¹ pela metade. Segundo Lorenzo *et al* ⁴⁰, cobre complexado com AH pode ser 20 ou 30 vezes menos tóxico que o cobre livre. As concentrações de Cu(II) em águas superficiais, na natureza, são menores do que 0,2 ppm, em geral. A ocorrência de cobre no meio ambiente (geradas por fontes antropogênicas) incluem corrosão de tubulações de latão por águas ácidas e efluentes de tratamento de esgoto. As principais fontes poluidoras são indústrias de mineração e fundição. No reino vegetal, os elementos Cu, Mn, Fe e Zn, quando em doses muito altas, podem produzir problemas às plantas como por exemplo, deformação nas folhas, alterações de cor das folhas e destruição dos tecidos ⁴¹. Hanstén *et al* ⁴² citam que as águas naturais do nordeste do hemisfério norte sofrem aumento no índice de acidez, devido ao derretimento da neve, no início da primavera, causando elevação de concentrações de metais. Desta forma, foi observado aumento nas concentrações de íons metálicos Al(III), e os divalentes Mn, Zn, Pb, Ni e Cd em lagos do sudeste da Finlândia, mas as SH presentes nessas águas tendem a reduzir os efeitos tóxicos desses metais. Os metais divalentes Cd, Cu, Pb e o Al(III) são os mais tóxicos a esses ecossistemas, enquanto que metais como

Zn(II), Mn(II) e Fe(III) são menos tóxicos. O aumento simultâneo nas concentrações de diferentes metais leva a complexas interações toxicológicas, cujo impacto final é difícil de prever. Moore ⁴³ observou em águas naturais nos EUA que as concentrações dos íons Zn (II) também variam de forma sazonal. Segundo Moore ⁴³, a contaminação de águas naturais pode ocorrer por resíduos de sulfetos metálicos (Cu_2S , Cu_5FeS_4 , CuFeS_2 , Cu_3AsS_4 , ZnS , PdS , CdS , etc), provenientes de minas vizinhas. O metal Cd aparece em solos agrícolas devido aos fertilizantes fosfatados. Rejeitos de indústrias também colaboram, tais como, pigmentos para tintas, plásticos, produção de baterias, pneus, etc ⁴².

Capítulo 2 – PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

2.1. Materiais

Os reagentes (grau de pureza P.A.) foram todos obtidos comercialmente e usados sem nenhum tratamento prévio. Foram usadas três substâncias como modelo das SH: ácido 2,4-dihidroxibenzóico 97% (Aldrich Chemical Co. Inc.), ácido benzeno-1,2-dicarboxílico 98% (Aldrich Chemical Co. Inc.), e ácido aminoacético 99,5% (Riedel-de Haën). As soluções estoque de Cu (II), Zn (II) e Cd (II), com concentração em torno de $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, foram preparadas (com água bidestilada e fervida) a partir dos seguintes sais: $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Vetec Química Fina Ltda), $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Vetec Química Fina Ltda), e $\text{CdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Vetec Química Fina Ltda), e padronizadas através de titulações diretas das soluções metálicas com solução padrão de EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) da Merck Chem.Co. $\sim 1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, na presença do indicador murexida (Merck Chem. Co.), utilizando solução tampão pH 8⁴⁴. A solução de KOH (hidróxido de potássio) padrão isenta de CO_2 usada nas titulações potenciométricas, foi preparada por diluição de ampolas Dilut-it (J.T. Baker Chemical Co.) de KOH concentrado e livre de CO_2 em concentração em torno de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Esta solução foi padronizada com biftalato ácido de potássio (Merck Chem. Co), seco a 110°C , por 2 h, utilizando solução de fenolftaleína (Merck Chem. Co.) 1% em etanol (Reagen) como indicador, e protegida através de um “trapp” contendo solução de KOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ para evitar a entrada de CO_2 atmosférico. O HCl (ácido clorídrico) da Synth, usado para calibrar o eletrodo antes de cada titulação, foi padronizado com KOH isento de CO_2 , usando fenolftaleína como indicador. Em todas as titulações, a força iônica foi mantida constante em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com a adição de eletrólito suporte KCl (cloreto de potássio) da Vetec Química Fina Ltda (sendo mais próxima da realidade e pela facilidade para comparar com dados da literatura). O ácido fúlvico do rio Suwannee (AFRS) usado neste trabalho (código:IR101F) foi obtido comercialmente da IHSS (Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas). A amostra, oriunda de águas do rio Suwannee, (**Figura 7**), foi extraída pela IHSS, de uma área de proteção ambiental (ecossistema costeiro), na fronteira com o estado da Geórgia, na região norte do estado da Flórida. As SH extraídas desse rio servem como referência para muitos trabalhos sobre AF e AH. A parte norte do rio Suwannee se origina das águas escuras do lago Okefenokee (sul da Georgia). O rio se expande formando

curvas ao longo da península da Flórida, atravessando 12 cidades, por 322 Km antes de desaguar no Golfo do México. Existem 2 parques estaduais ao longo do rio. A parte norte do rio é rica em cachoeiras, bancos de areia e rochas. A vegetação predominante ao longo de todo o rio inclui ciprestes, tupelos, além de muitas flores, tais como azaléias, gardênia e orquídeas. O fluxo de corrente do rio é lento. A água do rio tem cor marrom (semelhante a chá preto), devido à decomposição das folhas que caem no mesmo. Ao longo desse rio habitam 42 tipos de mamíferos, 54 espécies de peixes, 39 tipos de anfíbios e 232 tipos de pássaros. O rio varre uma área de 15.517 Km². Desde a descoberta dos E.U.A., o rio Suwannee tem sido um dos mais lendários. No final do século XVIII era refúgio de uma infinidade de piratas. Em 1980, o Comitê Gerenciador de Águas do rio Suwannee comprou 71,35 Km² por U\$11.000.000,00 para ajudar a preservar o rio para as futuras gerações^{45,46}. O AFRS foi escolhido pelo fato do mesmo ter sido caracterizado por algumas técnicas analíticas (espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN), espectroscopia de fluorescência, análise elementar, espectroscopia de absorção de luz na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)^{11,23,47,48}, facilitando a comparação com os resultados obtidos neste trabalho. Amostras de AF desta região foram escolhidas ainda, pelo fato de que as águas deste rio apresentam alto teor de matéria orgânica aquática, além de ser uma região em que não há oscilações climáticas bruscas, facilitando assim sua obtenção e extração para posteriores experimentos em laboratório, sem grandes variações de composição elementar ao longo do ano.



Figura 7 - Mapa indicando a localização do rio Suwannee no sudeste dos EUA⁴⁸.

2.2. Métodos

2.2.1. Titulação potenciométrica

A principal vantagem da utilização desta técnica é o fato de que, como se trata de um estudo em solução, a interpretação dos resultados deve ser muito mais aproximada do que ocorre na natureza. A titulação potenciométrica consiste em adicionar uma base padronizada (em incrementos determinados) à solução experimental, contendo o ligante, na presença e na ausência dos íons metálicos. Os valores das constantes de equilíbrio (de protonação ou de complexação) são determinadas através da análise dos valores obtidos das curvas de titulação de pH *versus* volume de base adicionados^{33,49}. No caso de SH foi conveniente fazer a simulação de seus componentes através de titulações potenciométricas de uma mistura de substâncias orgânicas com grupos funcionais típicos das SH (que foram determinados previamente por outras técnicas) para verificar a confiabilidade da técnica na determinação de grupos funcionais de substâncias tão complexas quanto às SH. Após a obtenção das curvas de titulação potenciométrica (pH *versus* volume de base), faz-se o tratamento dos resultados usando algum programa computacional que compare os valores calculados de pH com os valores experimentais para todos os pontos das curvas. O programa deve variar as constantes, minimizando as diferenças de pH calculadas e pH medidas até um erro mínimo. Também podem ser calculados através de métodos matemáticos, o que requer maior tempo. Neste trabalho, foram utilizados dois métodos: o método de Gran modificado, que é um método matemático, (para determinar quantidades molares de grupos ácidos), e o programa computacional BEST7, para determinar as quantidades molares dos grupos ácidos, bem como para calcular os valores das constantes de protonação e de complexação com os íons metálicos.

2.2.2. Programa computacional BEST7

O programa computacional BEST7 calcula as constantes de protonação dos ligantes e as constantes de equilíbrio dos complexos formados com os metais, como também as concentrações dos ligantes presentes e das espécies formadas. O valor inicial das constantes desconhecidas é obtido através da comparação com os valores das constantes conhecidas de substâncias semelhantes já estudadas (da literatura). O arquivo de entrada do programa

consiste de: a) o volume inicial da solução; b) os valores conhecidos das constantes de protonação dos ligantes e os valores aproximados das constantes dos complexos; c) as concentrações dos ligantes, metais, KOH (agente titulante) e d) os valores de pH em função dos volumes de KOH (valores experimentais obtidos na titulação). Este programa utiliza o método dos mínimos quadrados para minimizar as diferenças entre os valores de pH calculados e pH experimentais (ajuste não linear da curva de titulação), mantendo fixos os valores das constantes de equilíbrio conhecidas e variando os valores das constantes de equilíbrio que se quer determinar, minimizando o erro (as diferenças entre os valores de pH calculados e os valores experimentais) ^{33,49}.

2.2.3. Softwares SPE e SPELOT

Estes *softwares* foram usados para gerar e imprimir os diagramas de espécie, que mostravam a percentagem de espécies formadas durante as titulações. O SPE e o SPELOT foram elaborados utilizando o mesmo algoritmo matemático usado no BEST7 ⁴⁹.

2.2.4. Método de Gran Modificado

Com este método calcula-se as quantidades dos grupos funcionais das SH, divididos em grupos ácidos fracos e grupos ácidos fortes e o valor dos seus respectivos pKas. Este método é uma adaptação criada por Seymour em 1977 ⁵⁰, para o estudo de SH, e trata-se de uma variação do método de Gran ⁵¹, que consiste de equações lineares que descrevem equilíbrios de titulações de mistura de ácidos monopróticos fracos e de um ácido forte em presença de uma base forte (agente titulante) ⁵². O método de Gran modificado por Seymour ⁵² para a determinação dos grupos funcionais, funciona da seguinte forma: aplica-se este método aos dados das curvas de titulação potenciométrica das misturas de ácidos fortes e ácidos fracos, com uma base forte (agente titulante) ⁵². Seymour ⁵⁰ simplificou a equação representativa da titulação de uma mistura ácida, através da eliminação de algumas constantes matemáticas, fazendo algumas aproximações com base no fato de que no início das titulações (regiões de valores de pHs menores) os ácidos fracos encontram-se totalmente protonados.

Obtém-se desta forma, a seguinte equação simplificada:

$$(V_o + V).10^{-pH}$$

Onde: **V_o** = volume inicial da mistura a ser titulada.

V = volume dos incrementos de base que vão sendo adicionados ao longo da titulação.

pH = valores de pH correspondentes a cada V de incremento que é adicionado.

Aplica-se os valores obtidos das curvas de titulação potenciométrica (pH *versus* volume de KOH) à esta equação, e faz-se o gráfico $(V_o + V).10^{-pH}$ *versus* volume de base (mL). O resultado deste gráfico é uma reta. Traça-se uma reta paralela ao eixo x que intercepta o eixo y no ponto zero, dando origem ao ponto **V_s**. Na **Figura 8**, vê-se um exemplo de gráfico para a determinação do ponto **V_s**.

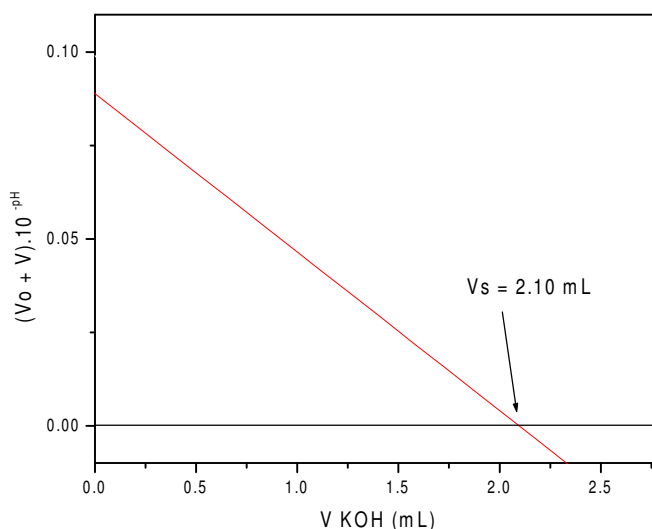


Figura 8 - Gráfico $(V_o + V).10^{-pH}$ *versus* volume de KOH (mL).

Lê-se o volume (**V_s**) equivalente de base para neutralizar todo o ácido forte (HCl, por exemplo) que é adicionado para baixar o pH da curva de titulação.

Para determinar a acidez total da mistura, usa-se os valores de pH acima de 7 da titulação, bem como os seus respectivos valores de volumes de KOH gastos.

Aplica-se estes valores à fórmula:

$$(V_o + V) \cdot 10^{-pOH}$$

onde:

V_o = volume inicial da mistura antes da titulação

V = volume dos incrementos de base que vão sendo adicionados ao longo da titulação, correspondentes a valores de pH acima de 7

pOH = valores obtidos a partir da seguinte relação: **pOH = 13,78 – pH**

Onde: **13,78** (constante de hidrólise da água)

pH = valores de pH acima de 7 das curvas de titulação.

Faz-se o gráfico $(V_o + V) \cdot 10^{-pOH}$ versus V de base (mL), o resultado deste gráfico é uma reta. Traça-se uma reta paralela ao eixo x que intercepta o eixo y no ponto zero, dando origem ao ponto **V_g**. Lê-se o volume (**V_g**) equivalente de base para neutralizar todos os ácidos da mistura (acidez total).

Na **Figura 9** vê-se um exemplo de gráfico para a determinação do ponto **V_g**.

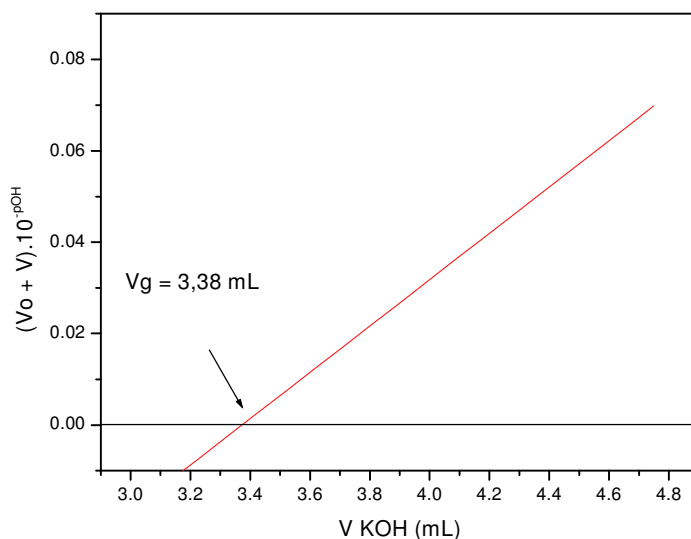


Figura 9 - Gráfico $(V_o + V) \cdot 10^{-pOH}$ versus volume de KOH (mL).

Para determinar a quantidade de grupos COOH faz-se a derivada primeira dos valores de pH (de toda a curva de titulação) em relação aos volumes dos incrementos de base ($\Delta \text{pH} / \Delta V$) e constrói-se um gráfico:

$\Delta \text{pH} / \Delta V$ versus Volume de base (mL).

Na **Figura 10** vê-se um exemplo de gráfico para a determinação do ponto **Vn**.

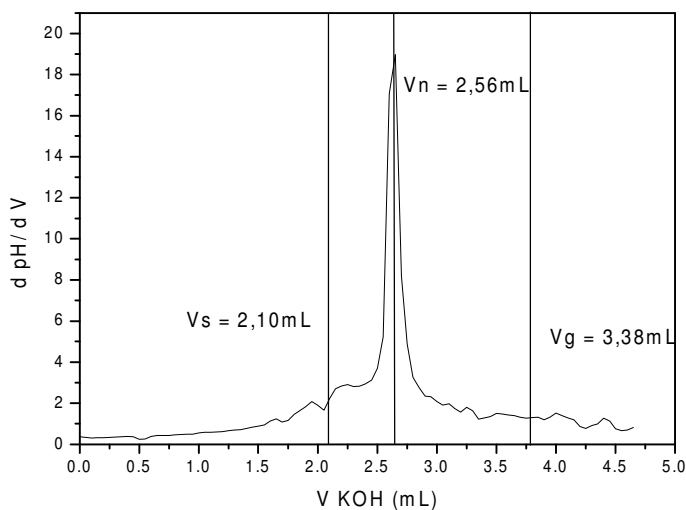


Figura 10 - Gráfico $\Delta \text{pH} / \Delta V$ versus Volume de KOH (mL).

O volume (**Vn**) correspondente de base para neutralizar todos os grupos COOH é o ponto de máximo da curva $\Delta \text{pH} / \Delta V$ versus volume de KOH (mL).

Acha-se o volume de base gasto para neutralizar todos os grupos fenólicos (**Vf**) fazendo-se a diferença:

$$V_f = V_g \text{ (referente à acidez total)} - V_n \text{ (referente aos grupos COOH)}$$

Para obter a quantidade dos grupos funcionais em meq, usa-se a seguinte relação:

Quantidade dos grupos

$$\text{funcionais (meq)} = (V_n, V_s, V_g \text{ ou } V_f) \times \text{Molaridade da base usada durante a titulação}$$

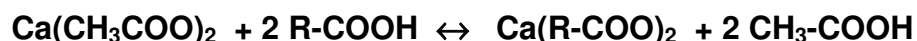
2.2.5. Análise clássica dos grupos funcionais: método de Schnitzer e Gupta

Esta metodologia foi usada para medir a acidez das amostras de AFRS, pois é o método mais recomendado pela literatura para SH (AF ou AH) ^{33,53,54,55}. Os hidrogênios dissociáveis são os principais contribuintes para a acidez das SH. Os principais grupos funcionais que liberam hidrogênios nas SH são as carboxilas e hidroxilas fenólicas. Em primeiro lugar, determina-se a acidez total (AT), utilizando o método do hidróxido de bário, que consiste na reação de excesso de Ba(OH)₂ com a SH. O excesso de base é titulado com HCl (solução padrão). O procedimento detalhado é o seguinte: transfere-se 10 mg de SH para um erlenmeyer e deixa-se reagir com 25 mL de Ba(OH)₂ 0,1 mol L⁻¹, sob atmosfera de N₂, durante 24 h, à temperatura ambiente. Faz-se um “branco” com 25 mL de solução de Ba(OH)₂ 0,1 mol L⁻¹. Filtra-se a suspensão e lava-se o resíduo com água bidestilada e fervida, completando o volume até 100 mL. Titula-se alíquotas de 50 mL com solução padrão de HCl 0,2480 mol L⁻¹ até pH 8,4, usando fenolftaleína como indicador. A acidez total é calculada em meq g⁻¹ com a seguinte equação:

$$AT = \frac{(V_a - V_b) \cdot M \cdot 10^3}{m_{(mg)} \text{ de SH}}$$

Onde: **Va e Vb** (simbolizam o volume de base padrão para titular a SH e o branco, respectivamente); **M** (concentração molar do HCl; **m** (representa a massa da amostra de SH em mg).

A determinação da acidez carboxílica é feita pelo método do acetato de cálcio.



Deixa-se a SH em reação com excesso de acetato de cálcio por 24 h, sob N₂ e à temperatura ambiente, e determina-se a quantidade de CH₃COOH liberado por titulação com NaOH (padrão). Transfere-se 10 mg de SH para um erlenmeyer e adiciona-se 10 mL de Ca(CH₃COO)₂ 0,105 mol L⁻¹. Completa-se o volume com 40 mL de água bidestilada e fervida. O sistema é mantido em N₂ por 24 h, à temperatura ambiente. A suspensão é filtrada com NaOH 0,02 mol L⁻¹.

Por fim, determina-se a acidez fenólica pela diferença da acidez total e dos grupos COOH, obtendo-se:

$$\text{OH}_{\text{fenólico}} = \text{AT} - \text{COOH}$$

2.2.6. Sistema operacional da titulação potenciométrica

As titulações potenciométricas foram realizadas em um sistema de célula de titulação de vidro termostatizada (com parede dupla), selada e sob atmosfera inerte (com gás argônio, da White Martins S.A, lavado com solução de KOH 0,1 mol L⁻¹, para eliminar CO₂ do sistema), de acordo com a **Figura 11**.

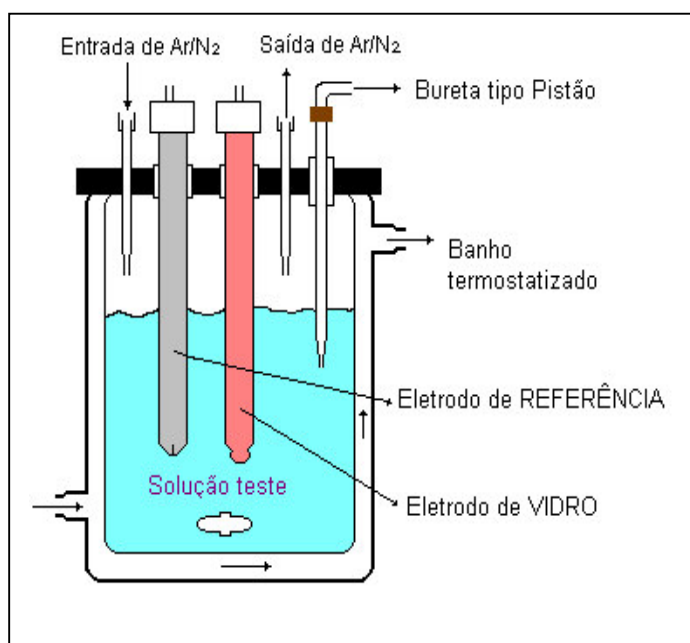


Figura 11 – Sistema utilizado na titulação potenciométrica ⁵⁶.

Como agente titulante foi utilizada solução padrão de KOH com concentração em torno de 0,1 mol L⁻¹. A força iônica foi mantida constante mediante adição de KCl ($\mu = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$), a temperatura foi mantida constante à $25,0 \pm 0,1 \text{ }^{\circ}\text{C}$, através de um banho termostatizado (Microquímica Equipamentos Ltda). Para o sistema de medida de pH, utilizou-se um pHmetro da marca CORNING modelo 350 equipado com um eletrodo de referência do tipo Ag/AgCl (marca *Thomas*, modelo Co-PHILA 1092-F15) e um eletrodo de vidro (marca *Thomas*, modelo AHT CO, 4090-J). A precisão do pHmetro é de 3 casas decimais. O agente titulante foi adicionado em alíquotas de 0,02 a 0,05 mL, utilizando uma bureta automática tipo pistão, de marca Schott Geräte. As

titulações só iniciavam após o equilíbrio dos valores de pH, ou seja, quando os valores de pH paravam de oscilar no leitor do pHmetro. Periodicamente, o sistema era calibrado, pela titulação de uma solução diluída de HCl ($1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) para verificar a inclinação da curva de titulação. Antes do início de cada titulação, o pH de uma alíquota de solução de HCl (aproximadamente $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) era medido: a diferença entre o valor do pH lido no pHmetro e o valor calculado, a partir da concentração de H^+ da solução diluída de HCl. Essa diferença é fornecida ao programa durante os cálculos das constantes de equilíbrios. Inicialmente, curvas de p[H] *versus* volume (mL) de $\text{KOH} \sim 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (agente titulante) foram obtidos e os cálculos das constantes de protonação, e das constantes de complexação, foram determinados com a ajuda do programa computacional BEST7 e as curvas de distribuição de espécies foram obtidas com o auxílio dos programas SPE e SPEPLOT ⁴⁹.

2.2.7. Titulação do sistema modelo para SH

As seguintes substâncias foram escolhidas para compor o sistema modelo de estudo para SH: ácido 2,4-dihidroxibenzóico, ácido benzeno-1,2-dicarboxílico, e ácido aminoacético (**Figura 12**). A escolha das substâncias se deu devido ao fato de possuírem os principais grupos funcionais das SH, do tipo ligantes duros (COOH ou fenólicos), como ligantes moles (grupos NH_2), constituindo assim, uma "mistura modelo universal" que pode ser usada para simular a complexação de íons metálicos com SH de qualquer origem (terrestre ou aquática). Adicionalmente, os grupos possuem diferentes faixas de constantes potenciométricas, o que facilita a interpretação dos resultados, sendo mais fácil de avaliar a eficácia do programa BEST7.

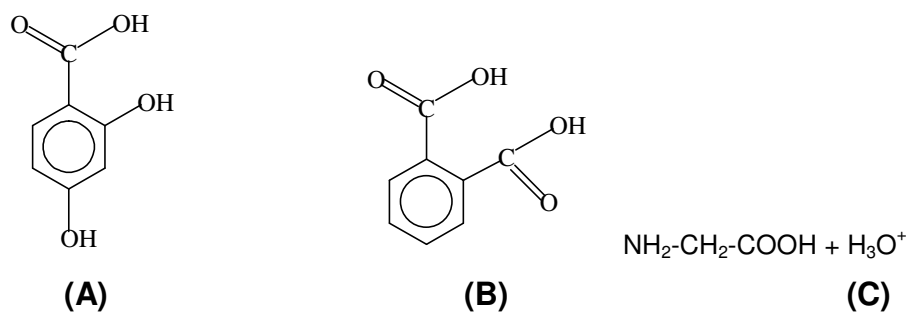


Figura 12 - Fórmulas estruturais das substâncias usadas para o sistema modelo: (A) ácido 2,4-dihidroxibenzóico, (B) ácido benzeno-1,2-dicarboxílico e (C) ácido aminoacético.

As seguintes titulações foram feitas (em triplicata): cada ácido individualmente, a combinação de dois ácidos, e de todos os três juntos. As titulações também foram feitas na presença dos íons Cu (II), Zn (II) e Cd (II). Após a determinação das constantes potenciométricas, para o sistema modelo, foram efetuadas as titulações do AFRS, na presença e na ausência de íons Cu (II), Zn (II) e Cd (II). Os cálculos para a determinação das quantidades dos grupos funcionais que constituem o AFRS e das constantes dos equilíbrios foram realizados.

2.2.8. Espectroscopia de absorção molecular de luz na região do ultravioleta e visível (UV-Vis)

A espectroscopia de absorção molecular de luz na região do ultravioleta e visível foi utilizada para caracterizar as espécies químicas formadas com os íons Cu (II) e os ligantes da mistura modelo. Os resultados foram comparados com aqueles obtidos por potenciometria. Os espectros de UV-Vis foram obtidos em um espectrofotômetro Perkin Elmer modelo Lambda 19, em cubetas de quartzo com caminho óptico de 1 cm.

2.2.9. Espectroscopia de absorção de luz na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Esta técnica foi usada para identificar os grupos funcionais na amostra de AFRS, bem como as suas interações com os íons metálicos (Cu(II) e Cd(II)). Os espectros foram feitos a partir de pastilhas de ~ 2 mg de AFRS (sem metal e complexado com o Cu(II) e o Cd(II), em 100 mg de KBr seco). Foram recolhidas alíquotas de 8 mL de solução durante as titulações em diferentes faixas de pH (3,5; 5,5; 7,0 e 10,0), para a titulação do AFRS sem metal e com metal. As alíquotas foram congeladas e liofilizadas (para desidratarem sem alterarem a estrutura), e com o sólido (pó) foram feitos os espectros. Os espectros foram realizados em um espectrômetro de infravermelho PERKIN-ELMER, modelo 16 PC. Os espectros foram obtidos de 650 à 4.000 cm^{-1} .

2.2.10. Espectroscopia de fluorescência

Esta técnica foi usada para caracterizar os principais fluoróforos na amostra de AFRS e avaliar a intensidade de suas ligações químicas com metais. Espectros de emissão de fluorescência das soluções do AFRS (20 mg L^{-1}) foram obtidos em um espectrofluorímetro Perkin Elmer, modelo LS5, à temperatura ambiente ($\sim 23^\circ\text{C}$). Foi usado o comprimento de onda de excitação (λ_{ex}) de 313 nm para gerar o espectro de emissão.

Capítulo 3 – RESULTADOS E DISCUSSÕES

Parte A - Estudo da mistura modelo para SH

3.1. Determinação das constantes de protonação dos grupos funcionais da mistura modelo

Foram escolhidas três substâncias com características ácidas. A escolha se deu devido às três substâncias possuírem grupos funcionais característicos da maioria dos AF encontrados na natureza^{11,23,55,57} e por apresentarem valores de constantes de protonação mais distantes um do outro, o que permite testar a eficiência do modelo. Foram feitas titulações potenciométricas das três substâncias separadamente, a combinação de duas a duas, e a titulação das três juntas, todas na ausência e na presença dos íons metálicos divalentes Cu, Zn e Cd.

Na **Figura 13**, vê-se os gráficos das titulações potenciométricas das substâncias separadas e da mistura das mesmas.

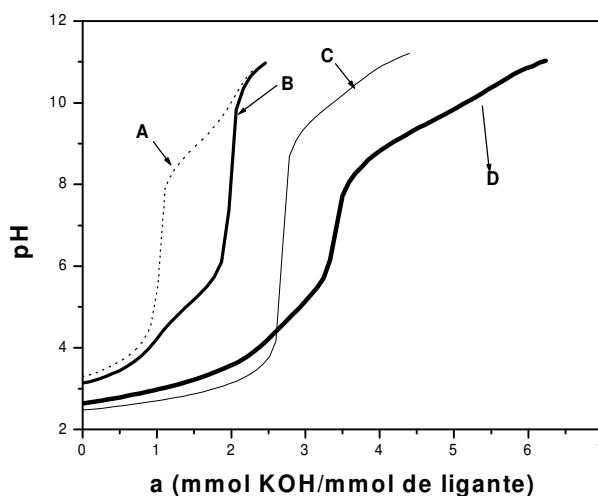


Figura 13 - Curvas $p[H]$ versus a (mmol KOH/mmol de ligante), onde:

(A) ácido 2,4-dihidroxibenzóico, (B) ácido benzeno-1,2-dicarboxílico,
(C) ácido aminoacético, e (D) mistura dos três ácidos.

$\mu=0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ KCl}$, $T=25^\circ \text{C}$, concentração de cada componente = $0,05 \text{ mmol}$ em 50 mL de solução.

A **curva (A)** representa a titulação do ácido 2,4-dihidroxibenzóico, onde ocorre primeiro a desprotonação do grupo carboxílico e depois a desprotonação do grupo fenólico em posição *para*, em relação ao grupo COOH. A desprotonação do outro grupo fenólico em posição *orto* ocorre somente em valores de pH muito

altos (acima de 13), em razão da formação de uma ligação de hidrogênio entre o OH fenólico e o COO^- ⁶⁰, elevando o primeiro pKa do grupo fenólico. A **curva (B)** representa a titulação do ácido benzeno 1,2-dicarboxílico, que perde durante o processo de dissociação 2 prótons dos grupos carboxílicos ($a = 2$). A **curva (C)** representa a titulação do ácido aminoacético que envolve a perda de 2 prótons ($a = 2,5$, sendo que 1,5 devido à adição do HCl para protonar o aminoácido). A **curva (D)** é a representação da titulação da mistura das 3 substâncias, neste caso, ocorre a desprotonação de 4 grupos carboxila, grupo fenólico e 1 grupo amino. Através dos dados das curvas potenciométricas, foram calculados, com auxílio do programa computacional BEST7, os valores das constantes de protonação de cada grupo ácido, para cada uma das três substâncias. Na **Tabela 7** vê-se os valores das constantes de protonação dos ácidos do sistema modelo para SH (em logaritmo).

Tabela 7 - Constantes de protonação obtidas para a mistura modelo (valores da literatura entre parênteses)⁶¹. Onde: **(A)** ácido 2,4-dihidroxibenzóico; **(B)** ácido benzeno-1,2-dicarboxílico e **(C)** ácido aminoacético. L (representa=A, B e C). As titulações foram feitas em triplicata.

Espécies	A (logK)	B (logK)	C (logK)
$[\text{HL}]/[\text{H}]\cdot[\text{L}]$	$13,37 \pm 0,00$ ($13,40 \pm 0,00$) ^a	$4,94 \pm 0,00$ ($4,92 \pm 0,00$)	$9,50 \pm 0,00$ ($9,56 \pm 0,00$)
$[\text{H}_2\text{L}]/[\text{HL}]\cdot[\text{H}]$	$8,60 \pm 0,00$ ($8,60 \pm 0,00$)	$2,75 \pm 0,00$ ($2,75 \pm 0,00$)	$2,39 \pm 0,00$ ($2,36 \pm 0,00$)
$[\text{H}_3\text{L}]/[\text{H}_2\text{L}]\cdot[\text{H}]$	$3,13 \pm 0,00$ ($3,13 \pm 0,00$)	-	-

^a foi medido por UV-Vis

Observa-se na **Tabela 7** que os valores das constantes de protonação obtidos e os valores da literatura⁶¹ são muito semelhantes, demonstrando-se o uso do programa computacional BEST7 para a determinação de constantes dos equilíbrios em misturas envolvendo diferentes grupos funcionais, numa faixa estreita de pH. Na **Figura 14**, vê-se o diagrama de distribuição de espécies da mistura modelo, que é obtido com o *software* SPEPLOT⁴⁹, utilizando-se os valores das constantes que foram calculadas com o programa computacional BEST7.

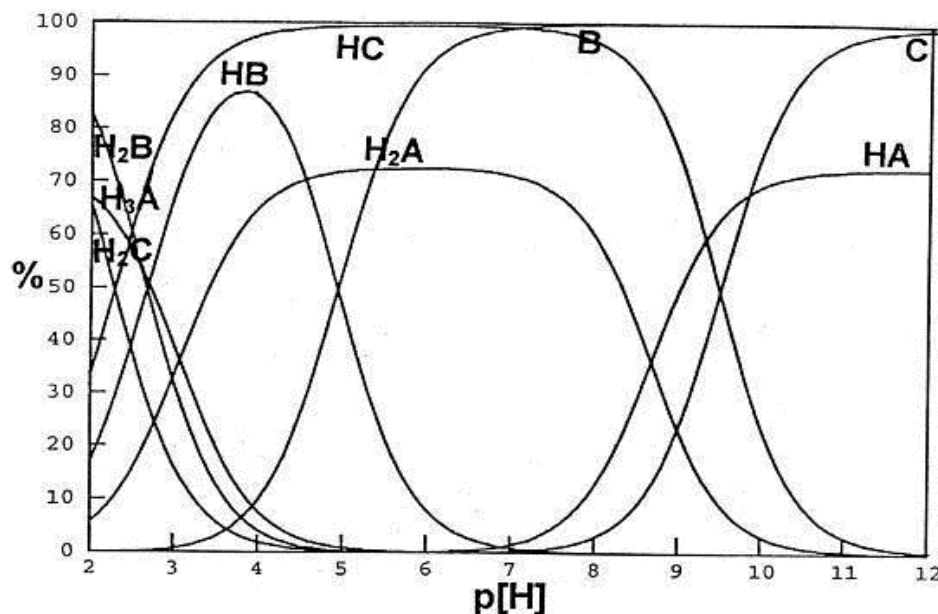


Figura 14 - Diagrama de distribuição de espécies da mistura modelo (% de espécies *versus* $p[H]$). Onde: H_3A – ácido 2,4-dihidroxibenzoico, H_2B - ácido benzeno-1,2-dicarboxílico, e H_2C - ácido aminoacético. Demais espécies aparecem desprotonadas. $\mu=0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ KCl}$, $T=25^\circ \text{C}$, Concentração inicial de cada componente = $\sim 0,05 \text{ mmols}$ em 50 mL de solução.

No diagrama de distribuição de espécies é possível observar (através dos pontos de máximo das curvas) que em $p[H] \sim 2$, as 3 substâncias aparecem protonadas. À medida que incrementos de base vão sendo adicionados, em $p[H] 3,8$ ocorre a máxima concentração das espécies HB (87%), em $p[H] 5$ há a máxima concentração da espécie HC (99%), em $p[H] 5,6$ existe a máxima concentração da espécie H_2A (72%). Em valores de pH acima de 5,1 predomina a espécie B completamente desprotonada, a espécie A diprotonada e a espécie C monoprotônica. O ácido 2,4-dihidroxibenzoico só irá perder totalmente seus prótons em valores de pH acima de 12, devido, principalmente às ligações de hidrogênio que se formam entre os grupos carboxilato e hidróxido. No caso do ácido aminoacético, a espécie completamente desprotonada predomina em valores de pH acima de 9,5.

3.2. Medidas das quantidades molares dos grupos funcionais da mistura modelo

A determinação da quantidade de grupos funcionais é necessária para podermos prever a quantidade de íons metálicos que irão se complexar nesses

grupos. A **Tabela 8** apresenta os valores das quantidades de grupos funcionais para a mistura modelo, calculados pelo método de Gran modificado, e a comparação dos valores calculados pelo programa computacional BEST7 e com os valores teóricos.

Tabela 8 - Valores das quantidades dos grupos funcionais oxigenados (meq g^{-1}) da mistura modelo calculados pelo método de Gran e por BEST7. Abaixo encontram-se os valores teóricos.

método	grupos carboxílicos	grupos fenólicos	acidez total
GRAN	$(3,18 \pm 0,20)$	$(3,20 \pm 0,50)$	$(6,37 \pm 0,07)$
BEST7	$(3,59 \pm 0,06)$	$(3,25 \pm 0,07)$	$(6,84 \pm 0,09)$
Teóricos	$(4,00 \pm 0,00)$	$(3,00 \pm 0,00)$	$(7,00 \pm 0,00)$

Os resultados da **Tabela 8** foram obtidos pela média de 3 titulações potenciométricas. Os valores obtidos pelo método de Gran, por ser um método matemático, linear, tem maior probabilidade de erro em relação ao método computacional BEST7, cujos valores mostraram-se ser mais próximos dos valores teóricos. Seymour⁵⁰ adaptou o método de Gran para a determinação somente dos grupos fenólicos e carboxílicos de SH, pois a maioria dos autores considera que os principais agentes complexantes sejam esses grupos oxigenados. Apesar de os grupos que contém nitrogênio complexarem muito bem com o Cu (II), por exemplo, sua quantidade é na maioria das vezes muito pequena em relação a esses grupos oxigenados. Desta forma os grupos nitrogenados não são incluídos no método de Gran. Tal consideração contém certamente uma certa margem de erro, pois não leva em conta outros grupos funcionais que as substâncias possam ter. Este procedimento será avaliado mais adiante.

3.3 Complexação dos grupos funcionais da mistura modelo com íons metálicos divalentes Cu (II), Zn (II) e Cd (II)

Foram feitas titulações potenciométricas de cada ácido separadamente na presença de Cu (II), Zn (II), e Cd (II) $\sim 0,01 \text{ mol L}^{-1}$, nas proporções de 1:1 e 2:1, ligante : metal. Também foram realizadas titulações de dois ácidos e da mistura modelo, na presença dos íons metálicos. Na **Figura 15**, vê-se as curvas de titulação potenciométrica para a mistura modelo na presença e na ausência dos íons Cu (II), Zn (II) e Cd (II).

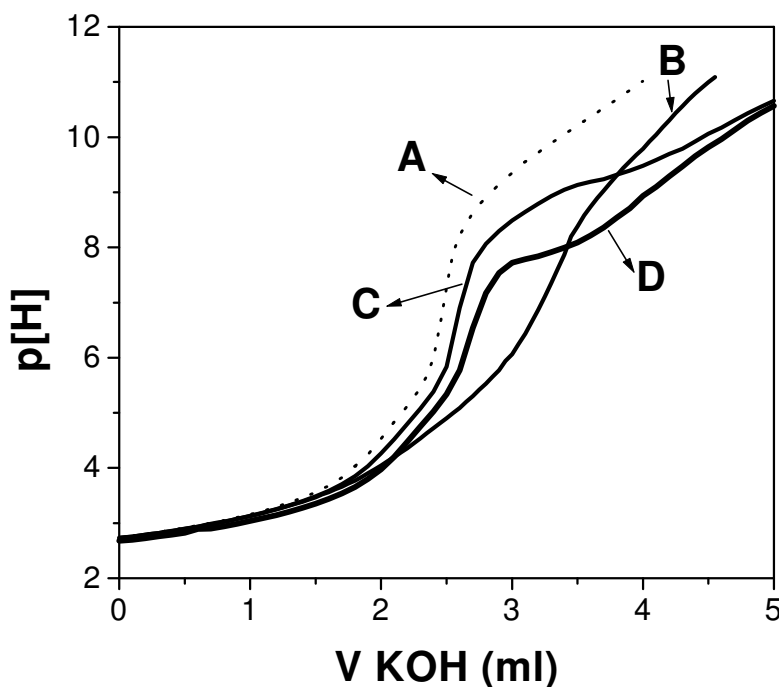


Figura 15 - Curvas de titulação potenciométrica: **(A)** mistura modelo, **(B)** mistura modelo com solução de Cu (II), **(C)** mistura modelo com solução de Zn (II), e **(D)** mistura modelo com solução de Cd(II), na proporção (em número de mmols) 1:1 (metal:ligante). ($\mu=0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ KCl}$, $T=25^\circ \text{C}$, Concentração de cada componente $\sim 0,05 \text{ mmols}$ em 50 mL de solução).

Inicialmente as curvas são sobreponíveis mas a partir de $p[H] 4$ começa haver a complexação dos íons metálicos pelos grupos funcionais da mistura modelo, o que provoca o deslocamento das **curvas (B), (C) e (D)** para a direita, em relação à **curva (A)**.

Na **Tabela 9** estão os valores das constantes de complexação dos íons Cu (II), Zn (II) e Cd (II) com as substâncias da mistura modelo, determinados pelo BEST7.

Tabela 9 - Constantes de equilíbrio (logK) para complexos de Cu(II), Zn(II) e Cd(II) com: **(A)** ácido 2,4-dihidroxibenzoico, **(B)** ácido benzeno-1,2-dicarboxílico, e **(C)** ácido aminoacético. L (representa = A, B e C). (valores da literatura entre parênteses) ⁶¹. OBS: O símbolo (-) indica que os valores não existem na literatura.

Espécies	A(logK)	B(logK)	C(logK)
$[\text{CuL}]/[\text{Cu}].[L]$	$5,96 \pm 0,03$ ($5,96 \pm 0,01$)	$3,22 \pm 0,03$ ($3,22 \pm 0,03$)	$8,13 \pm 0,05$ ($8,13 \pm 0,07$)
$[\text{CuL}_2]/[\text{Cu}].[L]^2$	$9,81 \pm 0,03$ ($9,80 \pm 0,04$)	$5,50 \pm 0,02$ ($5,46 \pm 0,01$)	$15,00 \pm 0,06$ ($15,00 \pm 0,10$)
$[\text{ZnL}]/[\text{Zn}].[L]$	$10,87 \pm 0,09$ (-)	$2,40 \pm 0,02$ ($2,20 \pm 0,01$)	$4,97 \pm 0,02$ ($4,96 \pm 0,03$)
$[\text{ZnOHL}].[H]/[\text{ZnL}]$	$0,33 \pm 0,09$ (-)	(-)	(-)
$[\text{ZnL}_2]/[\text{Zn}].[L]^2$	(-)	(-)	$9,29 \pm 0,06$ ($9,19 \pm 0,08$)
$[\text{CdL}]/[\text{Cd}].[L]$	$9,60 \pm 0,07$ (-)	$2,49 \pm 0,02$ ($2,50 \pm 0,01$)	$4,21 \pm 0,04$ ($4,24 \pm 0,03$)
$[\text{CdOHL}].[H]/[\text{CdL}]$	$0,23 \pm 0,09$ (-)	(-)	(-)
$[\text{CdL}_2]/[\text{Cd}].[L]^2$	(-)	(-)	$7,70 \pm 0,02$ ($7,71 \pm 0,02$)

Os valores das constantes de complexação para os íons metálicos divalentes (cobre, zinco e cádmio) e os valores da literatura ⁶¹ são muito semelhantes, indicando a aplicabilidade da técnica empregada. A seguir, na **Figura 16**, vê-se o gráfico de distribuição de espécies da mistura modelo e espécies formadas com os íons Cu(II) em percentagem *versus* p[H].

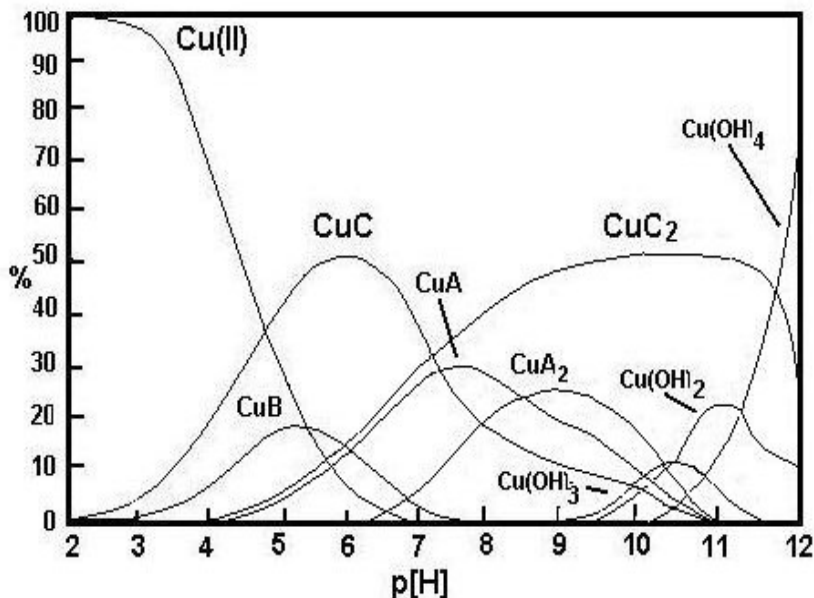


Figura 16 - Percentagem de espécies formadas com o metal Cu(II) versus p[H], na razão molar 1:1 (metal:ligante). Onde: ácido 2,4-dihidroxibenzóico (**A**), ácido benzeno-1,2-dicarboxílico (**B**) e ácido aminoacético (**C**). Somente as espécies que contém Cu(II) foram mostradas. $\mu=0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ KCl}$, $T=25^\circ \text{C}$, Concentração de cada componente $\sim 0,05 \text{ mmols}$ em 50 mL de solução.

Como se pode observar na **Figura 16**, a partir de p[H] 5 tem-se a formação do complexo CuB (quantidade máxima 19,1%), a seguir forma-se a espécie CuC em p[H] 5,5 (na concentração máxima de 50,7%) e a espécie CuA (29,7%) em p[H] 7. As espécies CuC₂ (49,1%) e CuA₂ (27,6%) aparecem acima de p[H] 8. A partir de p[H] 9, surgem as espécies hidróxidas com o íon Cu (II). Gerega *et al*⁶² fizeram estudos de complexação de ácidos dihidroxibenzóicos com íons Cu (II), utilizando titulação potenciométrica e espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica, e observaram que a capacidade de complexação dos ácidos dihidroxibenzóicos depende fortemente da posição de seus grupos doadores, sendo o catecol o mais efetivo, quando é usado o ácido 3,4-dihidroxibenzóico. Observaram também que abaixo de p[H] 5, a complexação com o Cu (II) ocorre primeiramente com os grupos carboxilatos, enquanto que os oxigênios dos fenolatos permanecem protonados. Micera *et al*.⁶³ argumentam que os grupos fenólicos mostram uma tendência de serem envolvidos em ligações de hidrogênio e, que em torno de p[H] 5, a maior parte das espécies formam complexos quelatos CuL (onde: L = ligante) nos quais um ligante se liga ao íon metálico, através dos carboxilatos e dos oxigênios dos grupos fenolatos

adjacentes. Um aumento posterior de pH leva à formação de outras espécies quelantes de complexos do tipo CuL_2 (onde: $\text{L} = 2$ ligantes), nos quais dois ligantes podem ser ligados como descrito no modo anterior ⁶⁰. Segundo Stevenson ⁶⁴, a formação de mais de uma ligação entre o metal e a molécula orgânica usualmente acarreta alta estabilidade ao complexo. O íon Cu(II) é um metal que coordena facilmente com a maioria dos grupos doadores das SH ⁶². Na **Figura 17**, como exemplo, vê-se um esquema resumido de como podem ser as estruturas dos complexos formados, onde o ligante (L) seria representado por um aminoácido qualquer (como exemplo simples de matéria orgânica) ⁶⁴. O íon Cu(II) sempre aparece como se estivesse no centro de um octaedro regular, podendo suportar pequenas distorções ⁶⁵.

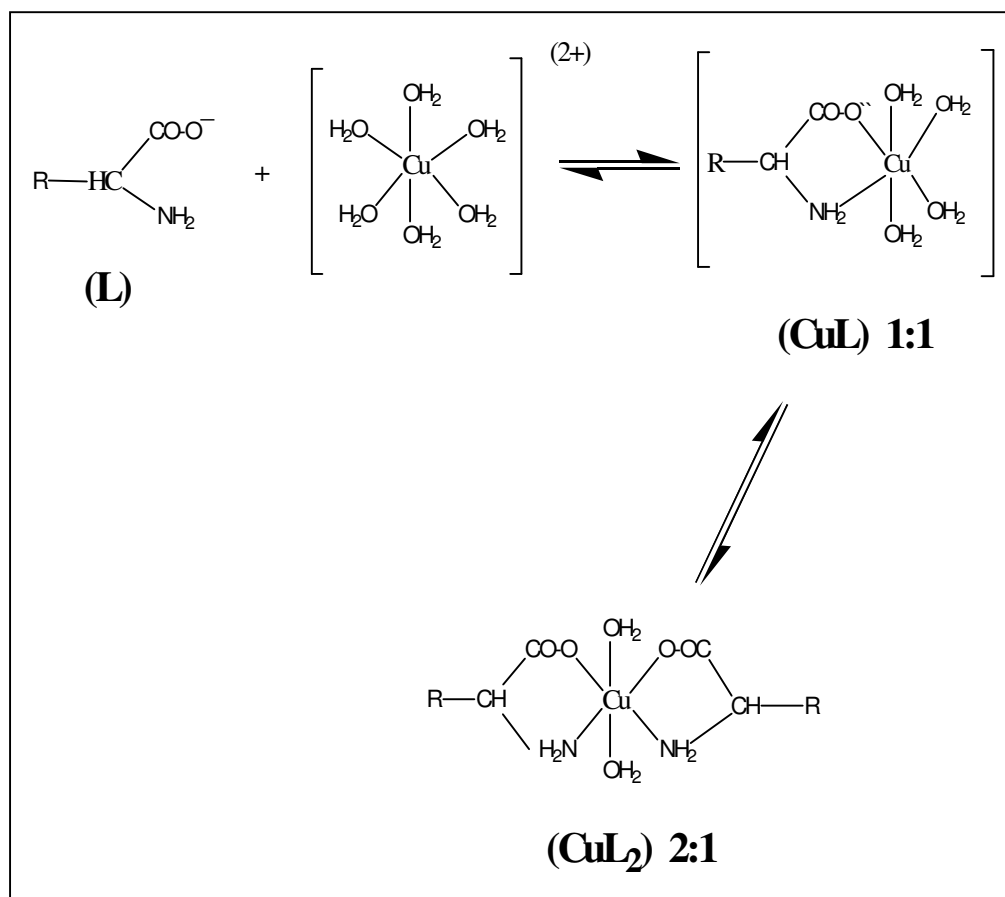


Figura 17- Formação de complexos CuL (1:1) e CuL_2 (1:2) de Cu(II) e aminoácido (L) ⁶⁴.

Desta forma e com base nos estudos realizados pelos autores citados anteriormente, pode-se formular algumas hipóteses para as estruturas dos

complexos formados, cuja distribuição foi calculada no diagrama de espécies da **Figura 16**. Na **Figura 18** estão representadas essas estruturas.

espécies	fórmula estrutural	p[H]	%
CuB		4,9	19,1
CuC		5,6	50,7
CuA		7,4	29,7
CuA ₂		9,5	27,6
CuC ₂		10,7	49,1

Figura 18 - Representação das estruturas dos complexos formados que foram detectados no diagrama de espécies da **Figura 16**.

Observa-se que o ácido aminoacético foi a substância que formou maior quantidade de espécies com os íons Cu (II). Para simular misturas onde a presença de grupos nitrogenados seja considerável, a inclusão de componentes com grupos funcionais nitrogenados é importante, uma vez que o íon Cu (II) forma complexos bastante estáveis com grupos que contenham o nitrogênio, mesmo que a quantidade desses grupos seja pequena. A presença desses grupos pode ser detectada por outras técnicas, tais como FTIR ou análise elementar (consideram-se os grupos nitrogenados no modelo somente quando aparece o nitrogênio acima de 3%). A formação de espécies com ligações COO⁻ com o Cu (II) ocorreu como foi descrito anteriormente, um pouco abaixo de p[H] 5. A seguir,

na **Figura 19**, vê-se o gráfico de distribuição de espécies da mistura modelo e espécies formadas com os íons Zn (II) em percentagem *versus* p[H].

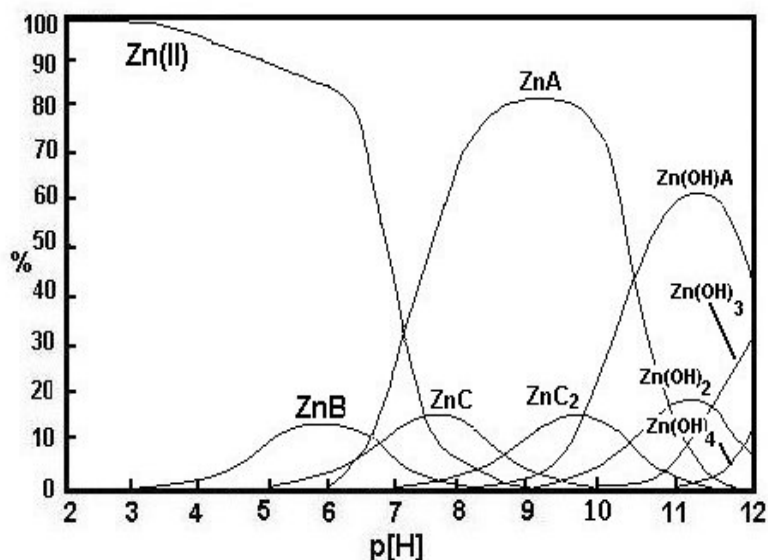


Figura 19 - Percentagem de espécies formadas com o metal Zn (II) versus p[H], na razão molar 1:1. (metal:ligante). Onde: ácido 2,4-dihidroxibenzóico (**A**), ácido benzeno-1,2-dicarboxílico (**B**), e ácido aminoacético (**C**). Somente as espécies que contêm Zn (II) foram mostradas. ($\mu=0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ KCl}$, $T=25^\circ \text{C}$, Concentração de cada componente $\sim 0,05 \text{ mmols}$ em 50 mL de solução).

Na **Figura 19**, vê-se a formação do complexo ZnB (quantidade máxima de 12%) ocorre acima de p[H] 5,8. A espécie ZnC (quantidade máxima de 14%) ocorre acima de p[H] 7,8, e a espécie ZnA (quantidade máxima de 81%) aparece acima de p[H] 9,2. A espécie ZnC₂ aparece acima de p[H] 9,7 na concentração máxima de 15%. Acima de p[H] 10,5, forma-se a espécie hidroxido Zn(OH)A em quantidade de até 63%. Acima de p[H] 11, produtos de hidrólise do íon Zn (II) aparecem e suas quantidades aumentam em valores de p[H] mais elevados. Na **Figura 20** vê-se estruturas sugeridas para os complexos formados da **Figura 19**.

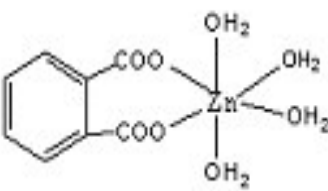
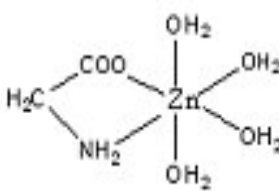
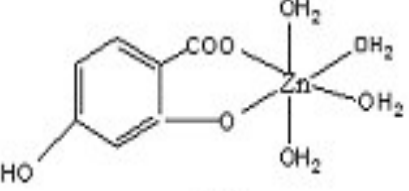
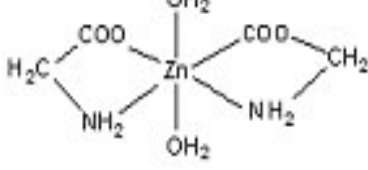
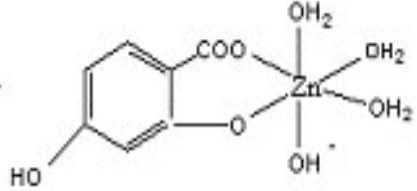
espécies	formula estrutural	p[H]	%
ZnB		5,8	12,0
ZnC		7,8	14,0
ZnA		9,2	81,0
ZnC ₂		9,7	15,0
Zn(OH)A		11,3	63,0

Figura 20 - Representação das estruturas dos complexos formados com o íon Zn(II) que foram detectados no diagrama de espécies da **Figura 19**.

Assim como o Cu (II), o Zn (II) formou complexos, em maior quantidade, com o ácido 2,4-dihidroxibenzóico (**A**) e com o ácido aminoacético (**C**), ligando-se, de modo preferencial, a grupos salicílicos. O Zn (II) formou uma espécie hidroxí (Zn(OH)A) com o ácido 2,4-dihidroxibenzóico.

Na **Figura 21**, vê-se o gráfico de distribuição de espécies da mistura modelo e espécies formadas com os íons Cd (II) em percentagem *versus* p[H].

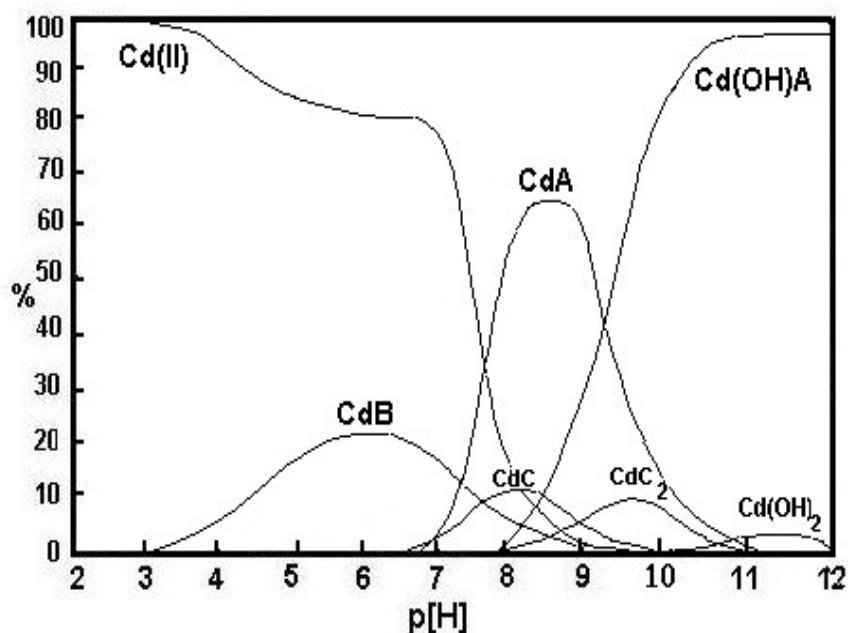


Figura 21 - Percentagem de espécies formadas com o metal Cd(II) versus p[H], na razão molar 1:1. (metal:ligante). Onde: ácido 2,4-dihidroxibenzóico (**A**); ácido benzeno-1,2-dicarboxílico (**B**) e ácido aminoacético (**C**). Somente as espécies que contém Cd(II) foram mostradas. ($\mu=0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ KCl}$, $T=25^\circ \text{C}$, Concentração de cada componente $\sim 0,05 \text{ mmols}$ em 50 mL de solução).

Na **Figura 21**, observa-se o máximo de formação do complexo CdB em pH 6,0, na quantidade de 21%. O complexo CdC aparece na quantidade máxima de 11% em pH 8,3. Com o ácido 2,4-dihidroxibenzóico (A) formam-se dois complexos: CdA em p[H] 8,5, onde apresenta-se 63% formado acima de pH 9,3 predomina a espécie Cd(OH)A atingindo uma quantidade de 95% em pH12.

Na **Figura 22** vê-se as estruturas dos complexos formados da **Figura 21**.

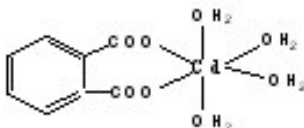
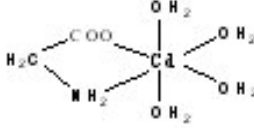
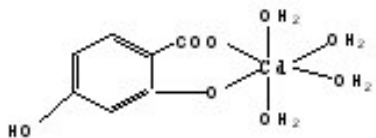
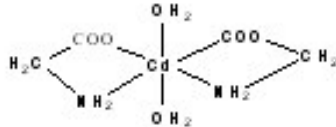
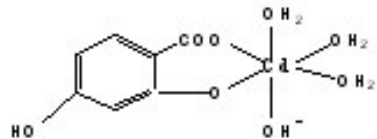
espécies	fórmula estrutural	p[H]	%
CdB		6,0	21,0
CdC		8,3	11,0
CdA		8,5	63,0
CdC₂		9,7	10,0
Cd(OH)A		12,0	95,0

Figura 22 - Representação das estruturas dos complexos formados com o íon Cd (II) que foram detectados no diagrama de espécies da **Figura 21**.

O Cd (II) demonstrou um comportamento muito semelhante ao do Zn (II), formando complexos, em maior quantidade, com o ácido 2,4-dihidroxibenzóico (**A**) e com o ácido aminoacético (**C**), ligando-se, de modo preferencial, a grupos salicílicos. O Cd (II) também formou uma espécie hidroxí (Cd(OH)A) com o ácido 2,4-dihidroxibenzóico. Observou-se nos diagramas de distribuição de espécies que próximo ao p[H] 5 a complexação dos metais bivalentes (Cu (II), Zn (II) e Cd (II)) ocorreu, numa primeira etapa, com os ânions carboxilato. Acima de p[H] 5, a maior parte das espécies formou complexos quelatos, nos quais um ligante liga-se ao cátion metálico através dos carboxilatos e dos oxigênios dos grupos fenolatos adjacentes. A seguir, formam-se outros quelatos do tipo ML_2 (onde: M = metal e L = ligante). O íon Cu (II) coordenou com todos os grupos funcionais da mistura modelo, formando apenas espécies do tipo ML e ML_2 . Os íons Zn (II) e Cd (II) apresentaram baixos valores de logK bem

como pequena quantidade de espécies formadas. Acima de p[H] 7 também foram observadas espécies hidróxidas do tipo MOHL, para os íons Cd (II) e Zn (II).

3.4. Aplicação da espectroscopia de absorção molecular de luz na região do ultravioleta e do visível (UV-Vis) na identificação de espécies de Cu (II) encontradas na potenciometria

O objetivo desta técnica foi o de comprovar a existência das espécies químicas (ML e ML₂) observadas na potenciometria, que surgem com o Cu(II) em diferentes faixas de pH. Os espectros de UV-Vis foram feitos usando alíquotas das soluções da mistura modelo, durante a titulação potenciométrica. Foram feitas medidas em 5 pHs diferentes.

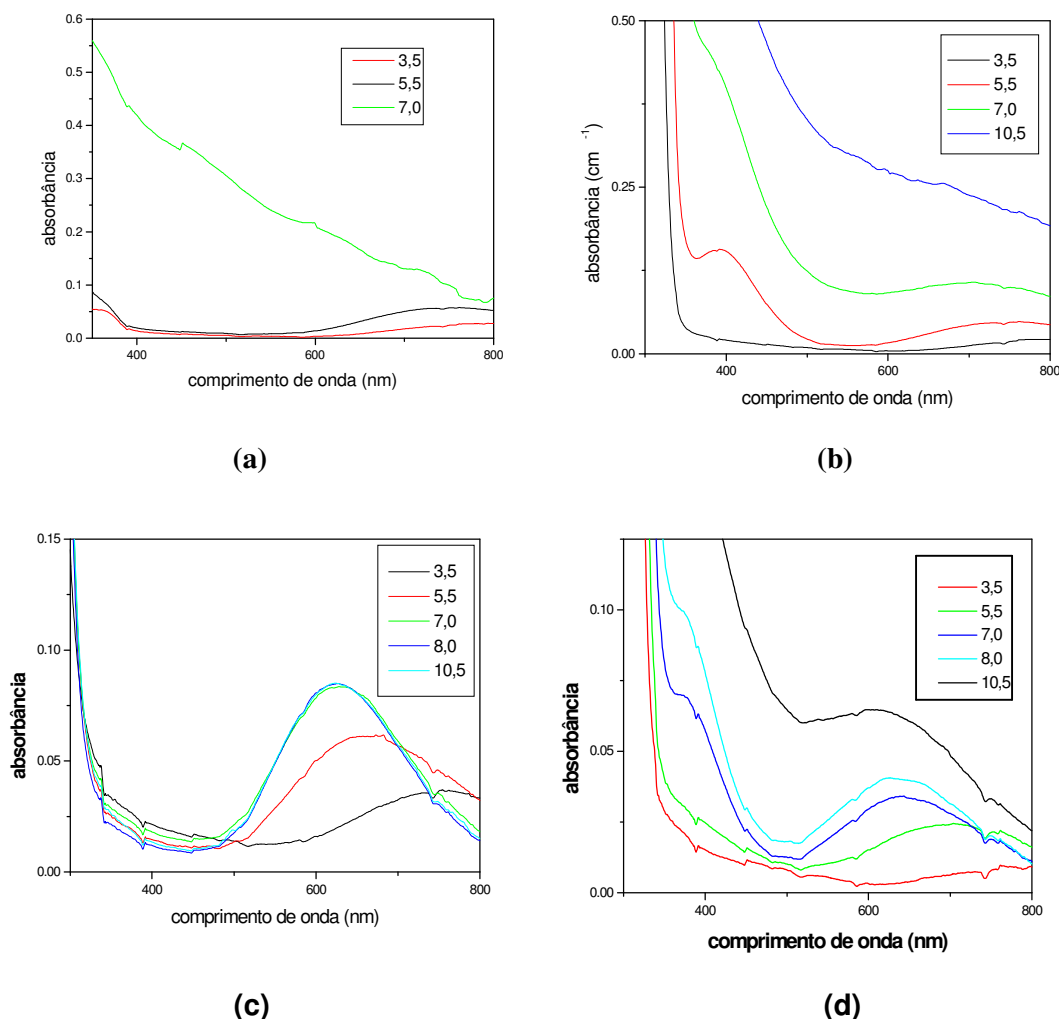


Figura 23 - Espectros de UV-Vis: **(A)** ácido benzeno-1,2-dicarboxílico; **(B)** ácido 2,4-dihidroxibenzoico; **(C)** ácido aminoacético e **(D)** da mistura modelo, sendo que todos foram titulados em presença de solução de Cu(II) $10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$.

Na **Tabela 10** estão representadas as espécies químicas encontradas por UV-visível durante a titulação potenciométrica da mistura modelo com os íons Cu (II), em 5 pHs diferentes.

Tabela 10 - Espécies químicas encontradas durante a titulação potenciométrica da mistura modelo com os íons Cu (II), em 5 pHs diferentes e respectivos comprimentos de onda (nm) encontrados na espectroscopia de UV- Vis. Valores da literatura entre parênteses ⁶⁰.

pH	Comprimento de onda(nm)	Comprimento de onda(nm)	Espécies químicas
3,5	-	-	-
5,5	389,5 (380)	726 (735)	ML (COO ⁻ , O ⁻)
7,0	383 (-)	649 (650)	ML ₂ 2 X (COO ⁻ , O ⁻)
8,0	381 (-)	641 (650)	ML ₂ 2 X (COO ⁻ , O ⁻)
10,5	-	640 (650)	ML ₂ 2 X (COO ⁻ , O ⁻)

Na **Tabela 10** os valores em torno de 380 nm correspondem a transferência de carga entre o doador do oxigênio do fenolato e o íon Cu (II). Valores em torno de 735 nm (formação da espécie ML) e 650 nm (formação da espécie ML₂) correspondem a aumento de energia nas transições *d-d*, nos grupos fenolatos ⁶⁰. A **Figura 23 (d)** é o espectro da mistura dos 3 ácidos orgânicos usados para representar o modelo de substâncias húmicas. Observa-se que a substância que menos formou complexos com o Cu (II) foi o ácido benzeno-1,2-dicarboxílico (**Figura 23 (a)**), pois formou espécies do tipo ML de pH 3,5 até pH 5,5, não tendo formado nenhuma espécie ML₂. Na **Figura 23 (b)** em pH 5,5 surge a espécie ML e a partir de pH 7,0 surge a espécie ML₂. Na **Figura 23 (c)** surge a espécie ML desde pH 3,5. Em pH 5,5 há a mistura das duas espécies ML e ML₂. Após pH 7,0 há grande formação da espécie ML₂. Todos os resultados obtidos por UV-Vis (**Figura 23**), comprovaram as espécies encontradas no diagrama de espécies obtido por potencimetria da **Figura 22**.

Parte B – Aplicação da metodologia desenvolvida ao estudo do AFRS

3.5. Medidas das quantidades molares dos grupos funcionais do AFRS

Inicialmente, para ter uma idéia aproximada, do total de grupos funcionais oxigenados divididos em duas grandes classes: fenólicos e carboxílicos, foram calculadas as quantidades desses grupos (em meq g⁻¹). Na **Tabela 11** vê-se os valores das quantidades de grupos funcionais para a amostra de AFRS, calculados pelo Método de Schnitzer e Gupta (método químico) e sua comparação com valores obtidos por outros métodos e outros autores ⁵⁴.

Tabela 11 - Valores das quantidades dos grupos funcionais oxigenados (meq g⁻¹) do AFRS calculados, neste trabalho, pelo Método de Schnitzer e Gupta (AFRS em C = 93 mg L⁻¹), e comparação com outros valores da literatura ⁴⁷ (em LEENHEER et al. 1995, e referências que constam no mesmo. OBS: Nas referências do artigo citado não constam os valores de desvio padrão das médias) *.

método	grupos carboxílicos	grupos fenólicos	acidez total
Schnitzer e Gupta	4,900 ± 0,110	6,600 ± 0,510	11,500 ± 0,500
Titulação potenciométrica *	6,10	-	-
Titulação potenciométrica*	5,65	-	-
Titulação potenciométrica * (solventes orgânicos)	4,15	-	-
Titulação potenciométrica *	6,00	-	-
RMN-C ¹³ , estado sólido *	6,20	-	-
Metilação e RMN-C ¹³ *	6,00	-	-
Metilação e RMN-H ¹ *	6,80	-	-

Os resultados da **Tabela 11**, para este trabalho (do método de Schnitzer e Gupta), foram obtidos pela média de 3 titulações. Como se pode verificar na **Tabela 11**, na literatura não existe um valor exato dos grupos funcionais dessas substâncias, apenas uma média aproximada, pois elas são misturas de macromoléculas complexas, que sofrem alterações na estrutura em algumas épocas do ano, por meio de oxidações e degradações térmicas, etc ^{47,48,55}. A seguir, com o uso do método BEST7, foram encontrados 5 espécies de grupos oxigenados: fenol – benzóico – catecol – ácido ftálico e ácido salicílico. Na **Tabela 12**, vê-se os valores das quantidades molares (meq g⁻¹) encontradas.

Tabela 12 – Valores das espécies oxigenadas (meq g^{-1}) do AFRS, divididas em 5 classes, calculados pelo método BEST7.

espécies oxigenadas (grupos funcionais)	Quantidade de grupos funcionais (meq g^{-1})
catecol	$3,300 \pm 0,010$
salicílico	$2,875 \pm 0,015$
ftálico	$2,450 \pm 0,030$
fenol	$1,650 \pm 0,060$
benzóico	$1,225 \pm 0,070$

Como se pode observar na **Tabela 12**, o mais alto valor obtido se refere aos grupos catecóis ($3,300 \pm 0,010 \text{ meq g}^{-1}$), e o mais baixo corresponde aos grupos benzoicos ($1,225 \pm 0,070 \text{ meq g}^{-1}$). Segundo Stevenson⁶⁶ é difícil fazer uma distribuição dos grupos oxigenados das SH devido a alguns fatores, tais como divergência da origem e pureza das SH (teor de cinzas, por exemplo); durante o processo de extração e purificação a amostra pode sofrer reações de oxidação ou adsorver reagentes; a variação de massa molecular, levando a fracionamento durante o manuseio da amostra; a proximidade de muitos e diferentes grupos funcionais reativos que influenciam a sua própria reatividade e a especificidade dos reagentes usados para a sua detecção (o que pode ser minimizado com o uso de técnicas analíticas instrumentais).

A seguir, na **Figura 24**, pode-se ver o modelo da matriz usada para calcular os valores dos mmols dos grupos oxigenados do AFRS, bem como o valor de suas constantes potenciométricas.

Resultados da Titulação do AFRS (IR101F da IHSS)

Fenol .0031100

benzóic .0122300 (quantidades em mmols)

catecol .006220

ftalico .024460

salicil .01534

H+ .11136

50.0 0.097001

0.0 0101 0200 0300 0400 0500 0600 (linha dos grupos fenólicos)

9.82 0101 0200 0300 0400 0500 0601

0.0 0100 0201 0300 0400 0500 0600 (linha dos grupos benzóicos)

4.56 0100 0201 0300 0400 0500 0601

0.0 0100 0200 0301 0400 0500 0600 (linha dos grupos catecóis)

13.0 0100 0200 0301 0400 0500 0601

22.24 0100 0200 0301 0400 0500 0602

0.0 0100 0200 0300 0401 0500 0600 (linha dos grupos ftálicos)

4.92 0100 0200 0300 0401 0500 0601

7.68 0100 0200 0300 0401 0500 0602

0.0 0100 0200 0300 0400 0501 0600 (linha dos grupos salicílicos)

13.4 0100 0200 0300 0400 0501 0601

16.21 0100 0200 0300 0400 0501 0602

0.0 0100 0200 0300 0400 0500 0601 (linha da hidrólise da água)

-13.78 0100 0200 0300 0400 0500 06-1

0.00 3.039 -11. -6. -7. -8. -10.

0.05 3.070

Figura 24 - Modelo de matriz usada para fazer os cálculos de refino das constantes potenciométricas (logK) e dos valores em mmols dos grupos oxigenados do AFRS usando o software BEST7. Onde:

$V_{\text{KOH}} \text{ (mL)} = 50.0 \quad 0.097001$ (normalidade da base KOH)

9.82 (constante de desprotonação dos grupos fenólicos (log K))

4.56 (constante de desprotonação dos grupos benzóicos (log K))

13.0 (primeira constante de desprotonação dos grupos catecóis (log K))

22.24 (segunda constante de desprotonação dos grupos catecóis (log K))

4.92 (primeira constante de desprotonação dos grupos ftálicos (log K))

7.68 (segunda constante de desprotonação dos grupos ftálicos (log K))

13.4 (primeira constante de desprotonação dos grupos salicílicos (log K))

16.21 (segunda constante de desprotonação dos grupos salicílicos (log K))

-13.78 (constante de formação da água)

Colunas: 0.00 3,039
0,00 3,070

... ..

As duas colunas representam os valores de titulação: volume de agente titulante (em mL de KOH), à esquerda, e os respectivos valores de pH, à direita. Os valores foram medidos até pH 12. Os valores: -11. -6. -7. -8. -10. (são os valores das concentrações molares (logK) da formação de cada espécie desprotonada).

Para determinar as constantes potenciométricas e as quantidades (em mmols) dos grupos oxigenados do AFRS, é necessário construir uma matriz como mostrada na **Figura 24**. É necessário fornecer os dados iniciais para a matriz, como por exemplo: constantes de protonação dos grupos oxigenados (obtidos da literatura, baseados em moléculas de substâncias simples, como ácidos orgânicos fracos, no presente caso: fenol, ácido benzóico, catecol, ácido salicílico e ácido ftálico).

3.6. Determinação das constantes de protonação dos grupos funcionais do AFRS

Através dos dados das curvas ($p[H]$ versus V_{KOH} (mL)), foram calculados, com auxílio do programa computacional BEST7, os valores das constantes de desprotonação de cada grupo ácido, para cada uma das cinco espécies oxigenadas principais do AFRS. Na **Tabela 13** vê-se os valores das constantes de desprotonação do AFRS (em logaritmo).

Tabela 13 - Constantes de desprotonação ($\log K$) para os grupos funcionais: fenól (**A**), benzóico (**B**), catecol (**C**), ftálico (**D**) e salicílico (**E**). Onde: L (representa = A, B, C, D e E). Valores da literatura entre parênteses ⁶¹.

Espécies	$\log K$
$[HA] / [H].[A]$	$9,95 \pm 0,06$ ($9,82 \pm 0,04$)
$[HB] / [H].[B]$	$4,49 \pm 0,03$ ($4,00 \pm 0,01$)
$[HC] / [H].[C]$	$13,13 \pm 0,07$ ($13,00 \pm 0,10$)
$[H_2C] / [HC].[H]$	$9,35 \pm 0,06$ ($9,24 \pm 0,04$)
$[HD] / [H].[D]$	$5,47 \pm 0,05$ ($4,92 \pm 0,01$)
$[H_2D] / [HD].[H]$	$3,07 \pm 0,03$ ($2,75 \pm 0,02$)
$[HE] / [H].[E]$	$13,49 \pm 0,01$ ($13,40 \pm 0,00$)
$[H_2E] / [HE].[H]$	$2,95 \pm 0,03$ ($2,81 \pm 0,01$)

Observa-se na **Tabela 13** que os valores obtidos para as constantes de desprotonação e os encontrados na literatura ⁶¹ são muito semelhantes, na maioria dos casos, e que as diferenças que ocorrem nos grupos ácidos mais fortes (ácido benzóico e ácido ftálico) podem ser explicadas por causa de efeitos polares e/ou estéricos de grupos substituintes ⁶⁷, bem como ligações de hidrogênio entre grupos ácidos tem efeito significativo na acidez destes grupos, estabilizando o ânion carboxilato por formação de ligações de hidrogênio intramoleculares, o que é capaz de aumentar o valor da constante

potenciométrica em 2 unidades, no caso dos grupos carboxílicos ⁶⁸. O diagrama de distribuição dos grupos ácidos e básicos do AFRS (**Figura 25**) é obtido com o *software* SPEPLOT ⁴⁹, usando os dados de entrada que foram calculados com o programa computacional BEST7.

A seguir, na **Figura 25** vê-se o diagrama de distribuição de espécies do AFRS.

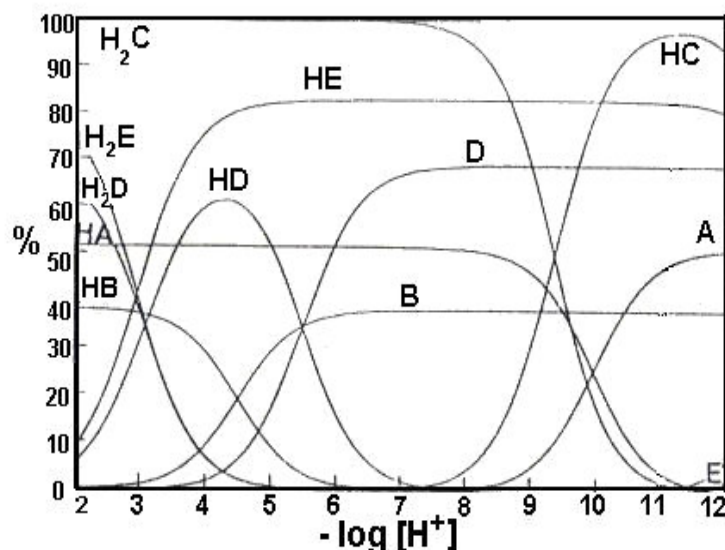


Figura 25 - Diagrama de distribuição de espécies do AFRS (% de espécies *versus* $-\log[H^+]$ ou $p[H]$). Onde: HA – fenol, HB – ácido benzóico, H₂C - catecol, H₂D - ácido ftálico, e H₂E - ácido salicílico, antes da perda de prótons. Demais espécies aparecem desprotonadas. $\mu = 0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ KCl}$, $T = 25^\circ \text{C}$, $C_{AF} = 80 \text{ mg L}^{-1}$.

No diagrama de distribuição de espécies observa-se (através dos pontos de máximo das curvas) que em $p[H]$ 2 (no início das titulações), os grupos funcionais ainda não perderam nenhum próton. À medida que incrementos de base vão sendo adicionados, em $p[H]$ 4,2 ocorre a máxima concentração das espécies HD (63%), em $p[H]$ 6 há a máxima concentração da espécie HE (82%). Em $p[H]$ 8, as espécies B (carboxilatos) e D (ftalatos) estão completamente desprotonadas, ou seja, todos os grupos COOH do AF foram desprotonados. No caso dos grupos fenólicos, catecóis e salicílicos, só vão perder totalmente seus prótons em $p[H]$ acima de 11.

3.7. Complexação dos grupos funcionais do AFRS com os íons divalentes cobre, cádmio e zinco

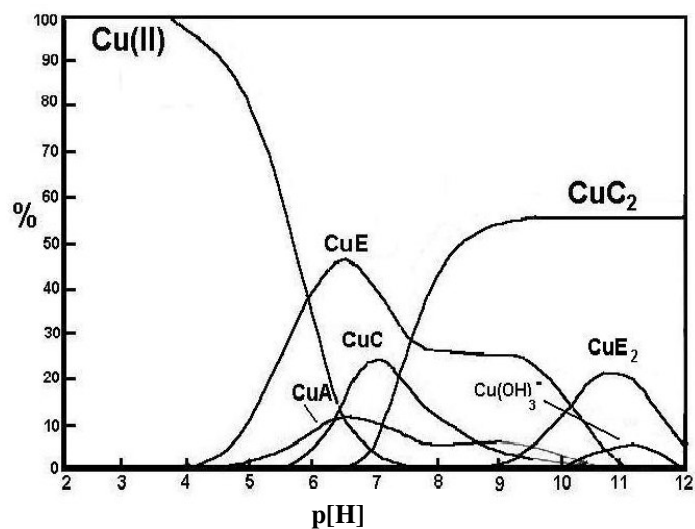
A seguir, na **Tabela 14** estão os valores das constantes de complexação dos íons Cu (II), Zn (II) e Cd (II) para os grupos funcionais do AFRS.

Tabela 14 – Constantes de equilíbrio (logK) para os íons Cu(II), Cd(II) e Zn(II) e os ligantes fenol (**A**), benzóico (**B**), catecol (**C**), ftálico (**D**) e salicílico (**E**) do AFRS. Onde: L (representa = A,B,C,D and E). Os valores da literatura estão listados entre parênteses ⁶¹. OBS: O símbolo (-) significa que os respectivos valores não foram observados experimentalmente e (*) valores não publicados.

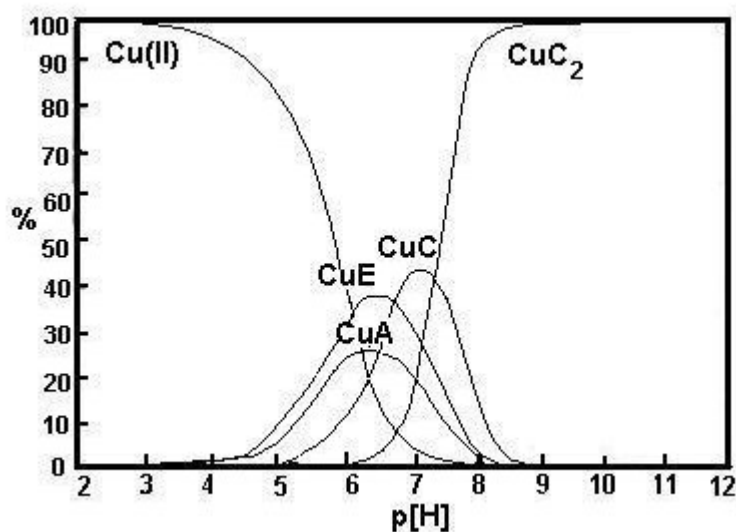
espécies	A (logK)	B(logK)	C(logK)	D(logK)	E(logK)
[CuL]/[Cu].[L]	7,62 ± 0,07 (*)	(-) (1,60 ± 0,01)	13,42 ± 0,05 (13,00 ± 0,06)	(-) (3,22 ± 0,03)	11.13 ± 0,02 (10.62 ± 0,02)
[CuL ₂]/[Cu].[L ²]	(-)	(-)	25,39 ± 0,08 (24,90 ± 0,10)	(-) (5,46 ± 0,04)	18.95 ± 0,05 (18.45 ± 0,01)
[CdL]/[Cd].[L]	(-)	(-) (1,40 ± 0,01)	8,81 ± 0,03 (8,20 ± 0,01)	2,60 ± 0,05 (2,50 ± 0,01)	(-)
[CdOHL].[H]/[CdL]	(-)	(-)	0,28 ± 0,02 (*)	(-)	(-)
[CdL ₂]/[Cd].[L ²]	(-)	(-)	16,78 ± 0,03 (*)	(-)	(-)
[ZnL]/[Zn].[L]	(-)	(-) (0,90 ± 0,02)	10,05 ± 0,02 (9,90 ± 0,01)	(-)	(-)
[ZnOHL].[H]/[ZnL]	(-)	(-)	0,48 ± 0,09 (*)	(-)	(-)
[ZnL ₂]/[Zn].[L ²]	(-)	(-)	17,91 ± 0,09 (17,40 ± 0,30)	(-)	(-)

Os valores das constantes de complexação para o Cu(II) e os valores da literatura são semelhantes ⁶¹, porém os valores de logK para os grupos salicilatos são um pouco maiores quando estão conectados à estrutura dos AF, daí o porquê dos valores experimentais serem um pouco maiores do que os dos grupos do ácido salicílico (substância simples ou ácido orgânico). Desta forma, algumas diferenças são esperadas devido ao fato do AFRS ser uma mistura tão complexa. Gerega *et al.* ⁶² apontam que ligantes fenólicos são importantes como constituintes de complexas SH, as quais são os principais ligantes, tomando parte no transporte e acumulação de íons nutrientes. Leenheer *et al.* ⁶⁸ comentam que em SH podem haver grupos funcionais do tipo salicilato e a forte acidez dos grupos salicílicos se dê pela formação de estruturas de 5 membros com ligações de hidrogênio intramoleculares entre os grupos fenólicos e o ânion carboxilato ⁶⁷.

Evidências disso seriam o logK da espécie ML (salicílico) diminuir 1,5 unidades e o logK da espécie ML_2 (salicílico) aumentar em 3 unidades, aumentando a ionização do primeiro próton e enfraquecendo a acidez do segundo próton. Fatores estéricos são significantes no aumento dos efeitos de ligações de hidrogênio na acidez. Em outras palavras, ligações de hidrogênio diminuem a acidez e aumentam o logK (conforme Leenheer *et al.* ⁶⁸ observaram por FTIR e potenciometria). Grupos doadores, lado a lado, aumentam a complexação formando complexos do tipo quelato. A seguir, na **Figura 26**, vê-se o gráfico de distribuição de espécies do AFRS complexado com o Cu (II) em percentagem *versus* p[H].



(a)



(b)

Figura 26 – Em (a) e (b) tem-se a percentagem de espécies do AFRS formadas com o Cu (II) versus p[H]. Onde: grupos fenolato (A); grupos benzoato (B); grupos catecolato (C); grupos ftalato (D) e grupos salicilato (E). $\mu = 0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ KCl}$, $T = 25^\circ \text{C}$, $C_{\text{AFRS}} = 93 \text{ mg L}^{-1}$, $C_{\text{sol CuCl}_2} = 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$. Em (a) $V_{\text{sol CuCl}_2} = 2$, (b) $V_{\text{sol CuCl}_2} = 0,5 \text{ mL}$

Como se pode observar na **Figura 26 (a)**, a partir de p[H] 4,0 tem-se a formação do complexo CuE (onde: E = salicilato) atingindo a quantidade máxima

de 48% em p[H] 6,5; a seguir forma-se a espécie CuA (onde: A = fenolato) atinge 11% em p[H] 6,5. A espécie CuC (onde: C = catecolato) se forma a partir de p[H] 5,5, atingindo o máximo de concentração em 22% em p[H] 7,0. A espécie CuC₂ inicia-se a partir do p[H] 6,6 (atingindo a concentração máxima de 58% em p[H] 9,0). A espécie CuE₂ inicia a sua formação em p[H] 9,0 e atinge o auge de 20% em p[H] 10,8. A partir de p[H] 10 surgem as espécies hidróxidas com o íon Cu (II). Na **Figura 26 (b)** observa-se que a complexação com o Cu (II) começa a partir do p[H] 4,0, começando a formação das espécies CuE e CuA, que atingem, respectivamente o auge de formação em p[H] 6,5 (38%) e p[H] 6,2 (25%). A espécie CuC começa a se formar a partir do p[H] 5, atingindo seu máximo em torno de p[H] 7,0 (43%). A espécie CuC₂ inicia-se a partir do p[H] 6,0 (atingindo o auge de formação em p[H] 8,0, em torno de 98%). Segundo Kiss *et al.*⁶⁰ em soluções aquosas diluídas de ácidos dihidroxibenzóicos, o catecol é o ligante que mais predomina como o sítio para ligação com o íon metálico, apesar do grupo COOH também participar na ligação. Isto leva à formação de espécies polinucleares⁶². Gerega *et al.*⁶² propõe que para haver a formação de espécies polinucleares (como por exemplo: Cu₂L₂, Cu₂L₃, Cu₃L₂, Cu_xA_y) a concentração de metal deve ser, pelo menos, um pouco superior a do ligante, ou seja, quantos ligantes houverem próximos aos íons metálicos. O íon Cu(II) poderá provocar, assim, agregação da matéria orgânica⁶². Leenheer *et al.*⁶⁸ argumentam a hipótese de que em SH podem existir grupos funcionais doadores que estejam distribuídos lado a lado, e perto de outros grupos ligados à ramificações adjacentes à cadeia. Os grupos funcionais (doadores) que são a parte polar hidrofílica das moléculas de SH complexariam com os metais. A parte apolar (hidrofóbica), o “esqueleto” das SH, poderia estar agregado a outras substâncias orgânicas em águas ou solos, por exemplo⁶⁸. Lu e Johnson³² observam que o complexo metal – SH é muito sensível ao pH e um precipitado é formado a partir de pH 7, sugerindo que o complexo é um complexo misto do tipo HS – Cu – H₂O. Este complexo é resistente ao pH maior do que 10 e se formam complexos semelhantes a retículos (*clusters*). A baixas concentrações de SH a percentagem do complexo formado cai com um aumento de pH e este complexo (retículo) não existe acima de pH 7. Se as concentrações de SH forem altas, serão formados complexos com alta estabilidade acima de pH 10. Porém, de pH 10 à pH 12, existem fortes competições entre SH – Cu e Cu(OH)_x

e as espécies SH – Cu diminuem e aumenta a concentração das espécies $\text{Cu}(\text{OH})_x$. Acima de pH 12 as espécies dominantes são os íons $[\text{Cu}(\text{OH})_4]^{2-}$ ³². Diversos autores observaram através de EPR (espectroscopia de ressonância paramagnética de elétrons) e estudos físico-químicos que o Cu (II) forma complexos de esfera interna com SH, contendo ligantes coordenados (ao redor do íon metálico central) em forma de octaedro distorcido^{14,69,70,71,72,73}. Carboxilas, hidroxilas fenólicas e eventualmente moléculas de água são indicadas como os principais grupos funcionais oxigenados que participam da complexação dos íons Cu (II) com AH ou AF^{71,72,74,75}. Estudos de EPR feitos por Bresnahan *et al.*⁷⁶ confirmaram a existência de duas classes de sítios de complexação oxigenados de diferentes afinidades pelos íons Cu (II) em AF, sendo observados também por experimentos de titulação. Em baixas razões metal : AF, os dados de EPR sugerem que sítios de alta intensidade de complexação coordenem com o Cu (II) com 4 ou 3 átomos de oxigênio de grupos como o carboxilato ou fenolato. Em razões maiores de Cu (II) para AF predominam vários sítios mais fracos e provavelmente somente 2 átomos doadores do AF são ligados a cada íon Cu(II)^{50,74}. A seguir, é apresentado o diagrama de espécies do AFRS complexado com íons Zn (II).

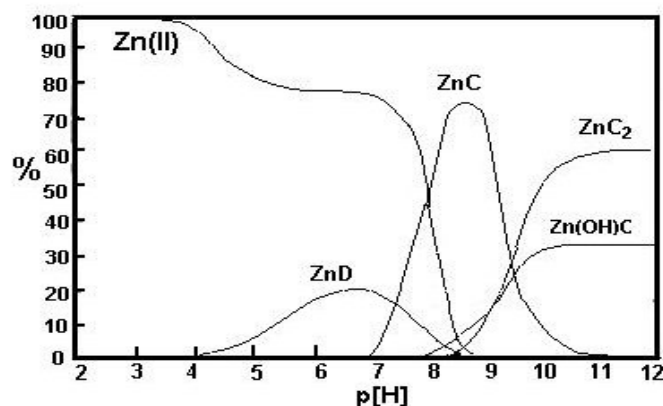


Figura 27 - Percentagem de espécies do AFRS formadas com o Zn (II) *versus* p[H].

Onde os grupos ligantes estão representados por fenolato (A), grupos benzoato (B), catecolato (C), ftalato (D) e salicilato (E).

$\mu = 0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ KCl}$, $T = 25^\circ \text{C}$, $C_{\text{AFRS}} = 93 \text{ mg L}^{-1}$, $C_{\text{sol Zn(NO}_3)_2} = 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, $V_{\text{sol Zn(NO}_3)_2} = 2 \text{ mL}$.

Na **Figura 27** observa-se que o Zn(II) formou 4 tipos de complexos com os grupos do ácido fúlvico: a partir de p[H] 4,0 formou a espécie ZnD (quantidade máxima: 22%, em p[H] 6,5), a partir de p[H] 6,8 formou a espécie ZnC (quantidade máxima 75%, em p[H] 8,5); a partir de p[H] 7,8 formou a espécie hidróxi Zn(OH)C (quantidade máxima 33%, em p[H] 10,0) e a espécie ZnC₂ formou-se após p[H] 8 (quantidade máxima 60%, em p[H] 10,5).

A seguir, na **Figura 28** vê-se o gráfico de distribuição de espécies do AF complexado com o Cd (II) em percentagem *versus* p[H].

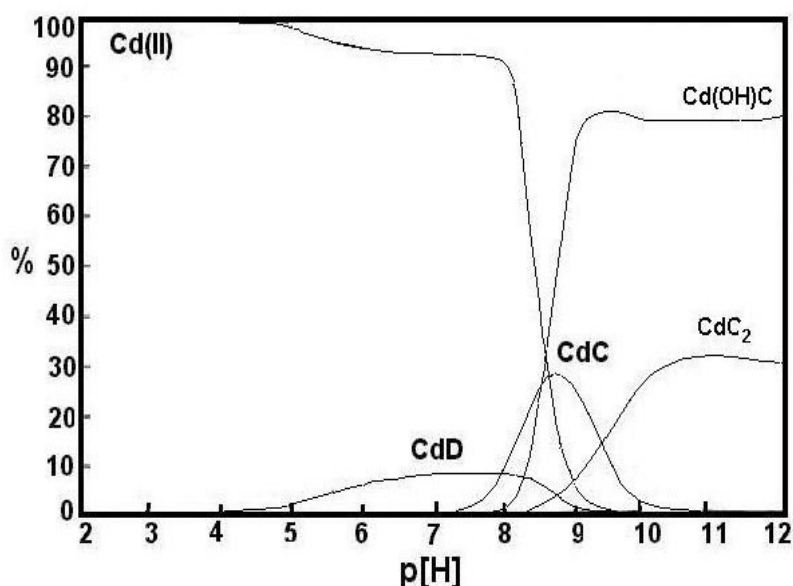


Figura 28 – Percentagem de espécies do AFRS formadas com o Cd (II) *versus* p[H]. Onde os grupos ligantes estão representados por fenolato (**A**), grupos benzoato (**B**), catecolato (**C**), ftalato (**D**) e salicilato (**E**). $\mu = 0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ KCl}$, $T = 25^\circ \text{C}$, $C_{\text{AFRS}} = 93 \text{ mg L}^{-1}$, $C_{\text{sol CdCl}_2} = 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, $V_{\text{sol CdCl}_2} = 2 \text{ mL}$.

Na **Figura 28** observa-se que o Cd (II) apresentou um comportamento químico muito semelhante ao Zn (II), formando o mesmo tipo de espécies. As espécies que se formam com o Cd (II) são a espécie CdD (onde: D = ftalato) atingindo quantidade máxima de 7% em p[H] 7,0; a partir do p[H] 7,2 formou-se a espécie CdC (onde: C = catecolato), cujo máximo foi de 28% em p[H] 8,8; a partir de p[H] 8,0 formou-se a espécie hidróxi Cd(OH)C, atingindo o máximo de 80% em p[H] 8,0; acima de p[H] 8,2 formou-se a espécie CdC₂ que atingiu seu auge de 30% em p[H] 10,8.

O grupo funcional mais reativo com os íons divalentes estudados foi o catecol, complexando com todos os íons metálicos divalentes analisados. Em segundo lugar, destacam-se os grupos salicilato complexando em grande quantidade com os íons Cu (II). De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, pode-se fazer a seguinte série de reatividade para os íons bivalentes e o AFRS: Cu (II) >> Cd (II) > Zn (II). Na literatura existem muito poucos trabalhos envolvendo o estudo da complexação dos íons Cd (II) e Zn (II) por AF. A maioria dos poucos estudos que tem surgido, descrevem a complexação de íons metálicos com o ligante fulvato, ou seja, são considerados todos os grupos reativos do AF como uma única espécie de ligante⁵³. Desta forma, é impossível prever com exatidão que tipo de espécies está se formando com o AF, sendo possível apenas ordenar os íons metálicos em uma série de reatividade em relação ao AF. Brown *et al*⁷⁷ observaram a mesma série de reatividade observada neste trabalho, para o AFRS. Ephraim⁵³ analisou a complexação de íons Zn(II) com AF através de distribuição de troca iônica e método de ultrafiltração aplicando o método de distribuição de sítios heterogêneos e propôs que o íon Zn(II) se ligaria a sítios onde houvessem OH ligados adjacentes a outros grupos OH, como é o caso do catecol. No presente trabalho houve complexação do zinco apenas com grupos catecol, aparecendo espécies do tipo ML, MOHL e ML₂ (onde: M = íon metálico e L = ligante = catecol).

3.8. Aplicação da espectroscopia de absorção de luz na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) no estudo das interações dos íons Cu (II) e Cd (II) com o AFRS

Os resultados de FTIR podem ser usados para análise qualitativa na caracterização de SH porque, devido ao fato das SH serem uma complexa mistura de macromoléculas orgânicas, o espectro deve ser interpretado como a soma das respostas dos vários grupos funcionais que compõe a SH ³⁸. O fato das bandas dos espectros das SH serem largas se deve à sobreposição das bandas de absorção dos diferentes ligantes que possuem ⁷⁸. A formação dos complexos metal-SH pode ser estudada por FTIR através dos deslocamentos dos comprimentos de onda dos espectros. Isto pode ser usado para identificar quais são os grupos funcionais que são envolvidos na complexação e fornecer informações sobre o tipo de interação que se forma entre o metal e a SH no complexo formado. Resultados obtidos por FTIR têm levantado evidências a respeito dos grupos COOH dos AH e AF na complexação com metais. A banda C=O de estiramento de absorção em aproximadamente 1720 cm^{-1} e as absorções de deformação de estiramento de C-O e O-H em aproximadamente 1200 cm^{-1} desaparecem após ionização dos grupos COOH e surgem novas bandas próximo a 1600 e 1380 cm^{-1} , devido a vibrações de estiramento assimétrico e simétrico dos grupos COO^- ³⁸, respectivamente. Alguns estudos de FTIR da complexação de AF e de AH de diferentes solos, ecossistemas aquáticos e fontes sedimentares para diversos íons metálicos divalentes e trivalentes, tais como Cu(II), Mn(II), Zn(II), Pb(II), Co(II), Ni(II), Ca(II), Mg(II), Sr(II), Fe(III), Al(III) mostraram que os complexos preparados com aumento crescente da razão metal:AF sofrem diminuição na intensidade das bandas de infravermelho de $\sim 1720\text{ cm}^{-1}$ e $\sim 1200\text{ cm}^{-1}$, com surgimento de bandas em 1625 e 1400 cm^{-1} (aproximadamente), indicando converção dos grupos COOH à COO^- ^{14,75,78,79,80}. Banerjee e Mukherjee ⁷⁸ sugeriram a seguinte ordem para interação de íons metálicos bivalentes com grupos carboxilato em vários complexos de SH: $\text{Cu} > \text{Zn} > \text{Fe} > \text{Co} > \text{Mn}$. As frequências das vibrações de estiramento assimétrico e simétrico do COO^- podem ajudar a resolver a controvérsia que existe do fato das ligações dos COO^- serem iônicas ou covalentes. Com o aumento da covalência nos complexos metal : carboxilato, surgem deslocamentos dos estiramentos assimétricos das bandas COO^- para mais alta frequência e estiramentos

simétricos das bandas para menores frequências. Vinkler *et al.*⁸¹ estudaram a influência de alguns íons metálicos no estiramento assimétrico COO^- em complexos com SH. Bandas de absorção entre 1585 cm^{-1} para o Ca (II) e 1625 cm^{-1} para o Al (III), por exemplo, indicaram um diferente grau de covalência para diversos metais examinados⁸¹. Piccolo e Stevenson⁸⁰ observaram que ligantes covalentes para o Cu (II) em SH são preferencialmente formados em baixos níveis de íons metálicos, enquanto que ligações iônicas começam a surgir quando o sistema está saturado com o metal. Interpretações na região de 1620 cm^{-1} são difíceis, devido à interferência de outros grupos. A natureza do sítio de ligação carboxilato em SH pode ser avaliada através de medida de separação entre as duas frequências das vibrações de estiramento assimétrico e simétrico para o metal complexado com o grupo COO^- (próximo de 1600 e 1400 cm^{-1} , respectivamente), com respeito ao íon carboxilato não complexado. Esta separação é maior em complexos unidentados (**Figura 29 (a)**), menor em complexos bidentados (quelatos, conforme **Figura 29 (b)**) e comparáveis em complexo de ponte (**Figura 29 (c)**)⁸².

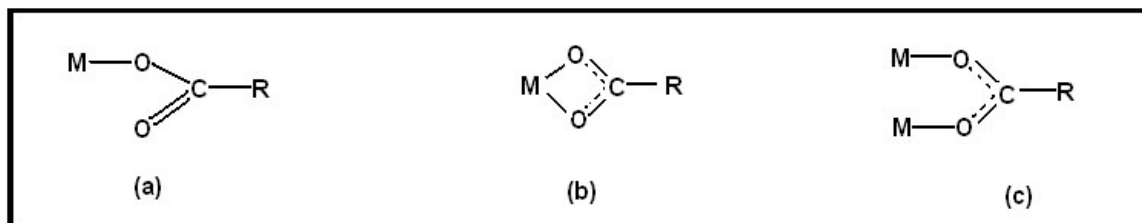


Figura 29 – Tipos de ligações químicas encontradas para a complexação de grupos COO^- de SH com íons metálicos **(a)** unidentada, **(b)** quelato (bidentado), **(c)** complexo de ponte.

A seguir são apresentados os espectros de FTIR do AFRS complexado com os íons Cu (II) e Cd (II), nas **Figuras 30, 31, 32 e 33** em diferentes pH.

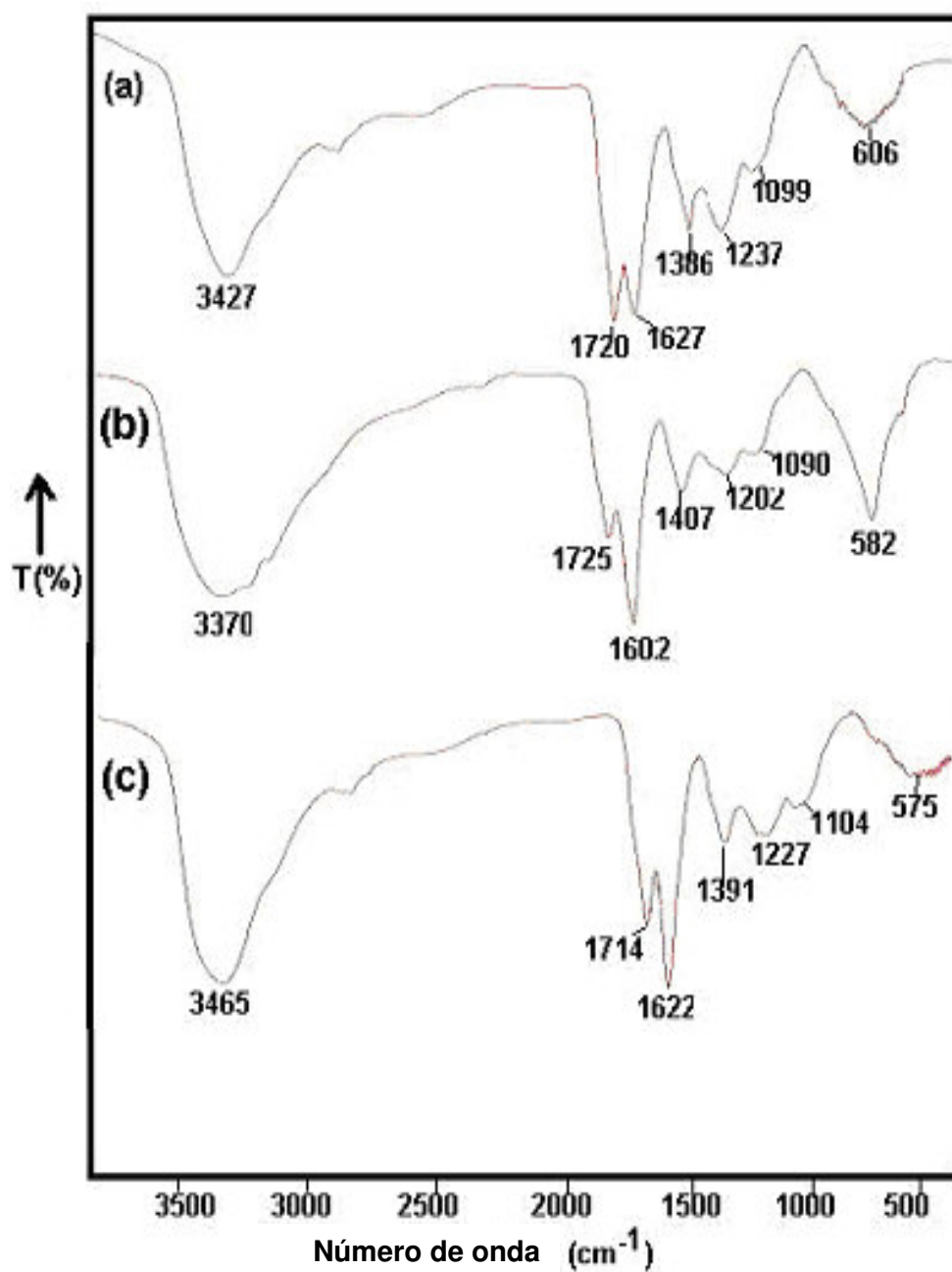


Figura 30 – Espectros de FTIR do AFRS complexado com os íons Cu (II) e Cd (II) em p[H] 3,5: **(a)** AF (puro), **(b)** AF/Cu (II), **(c)** AF/Cd (II).

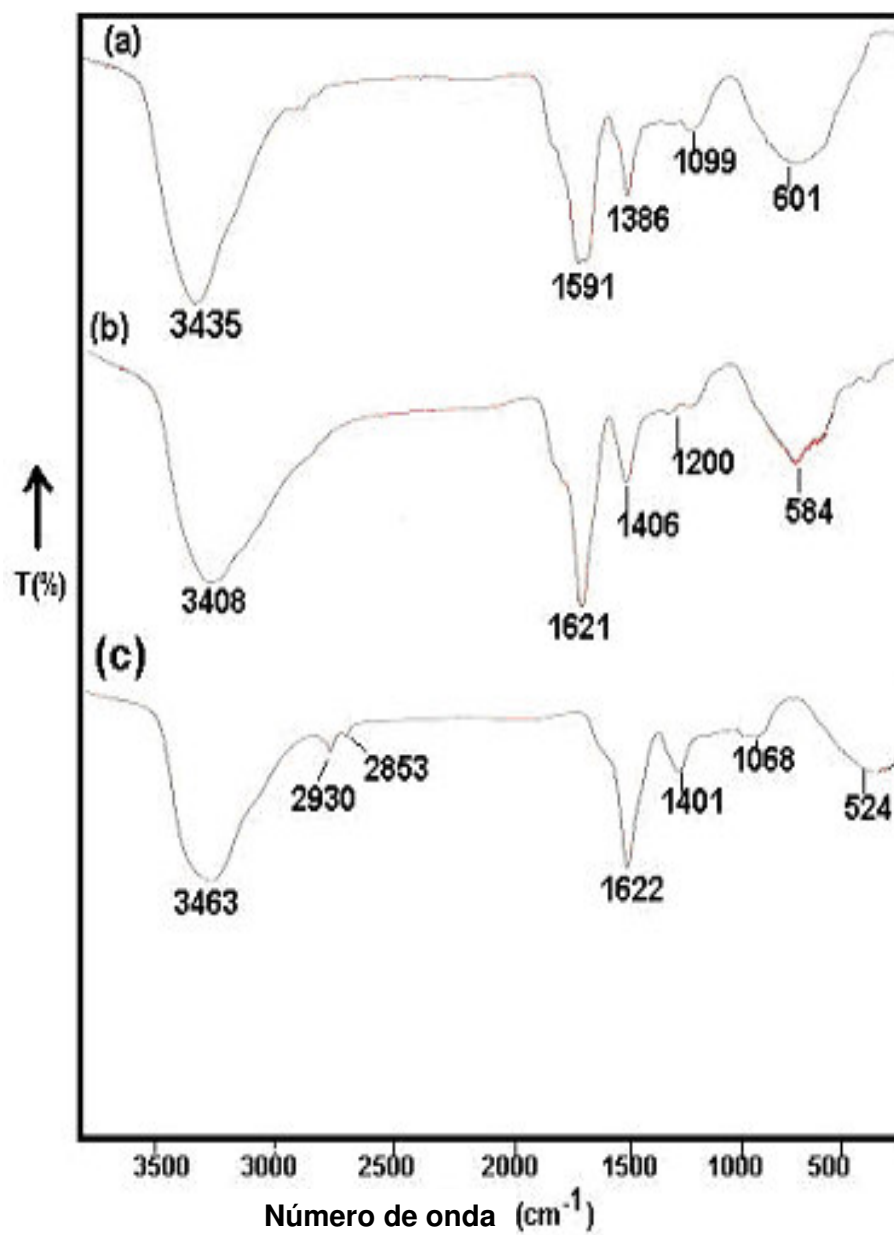


Figura 31 – Espectros de FTIR do AFRS complexado com os íons Cu (II) e Cd (II) em p[H] 5,5: **(a)** AF (puro), **(b)** AF/Cu (II) e **(c)** AF/Cd (II).

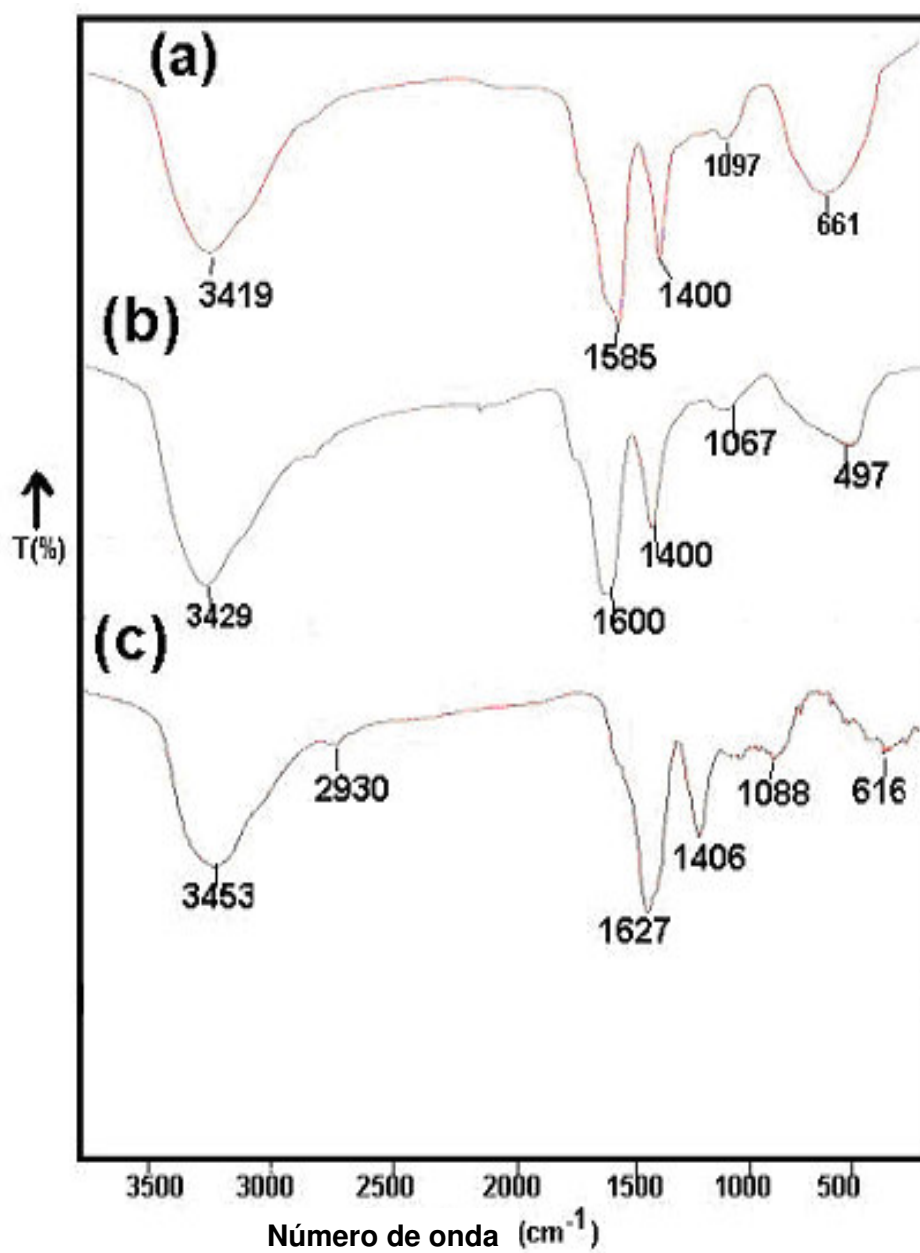


Figura 32 – Espectros de FTIR do AFRS complexado com os íons Cu (II) e Cd (II) em p[H] 7,0: **(a)** AF (puro), **(b)** AF/Cu (II) e **(c)** AF/Cd (II).

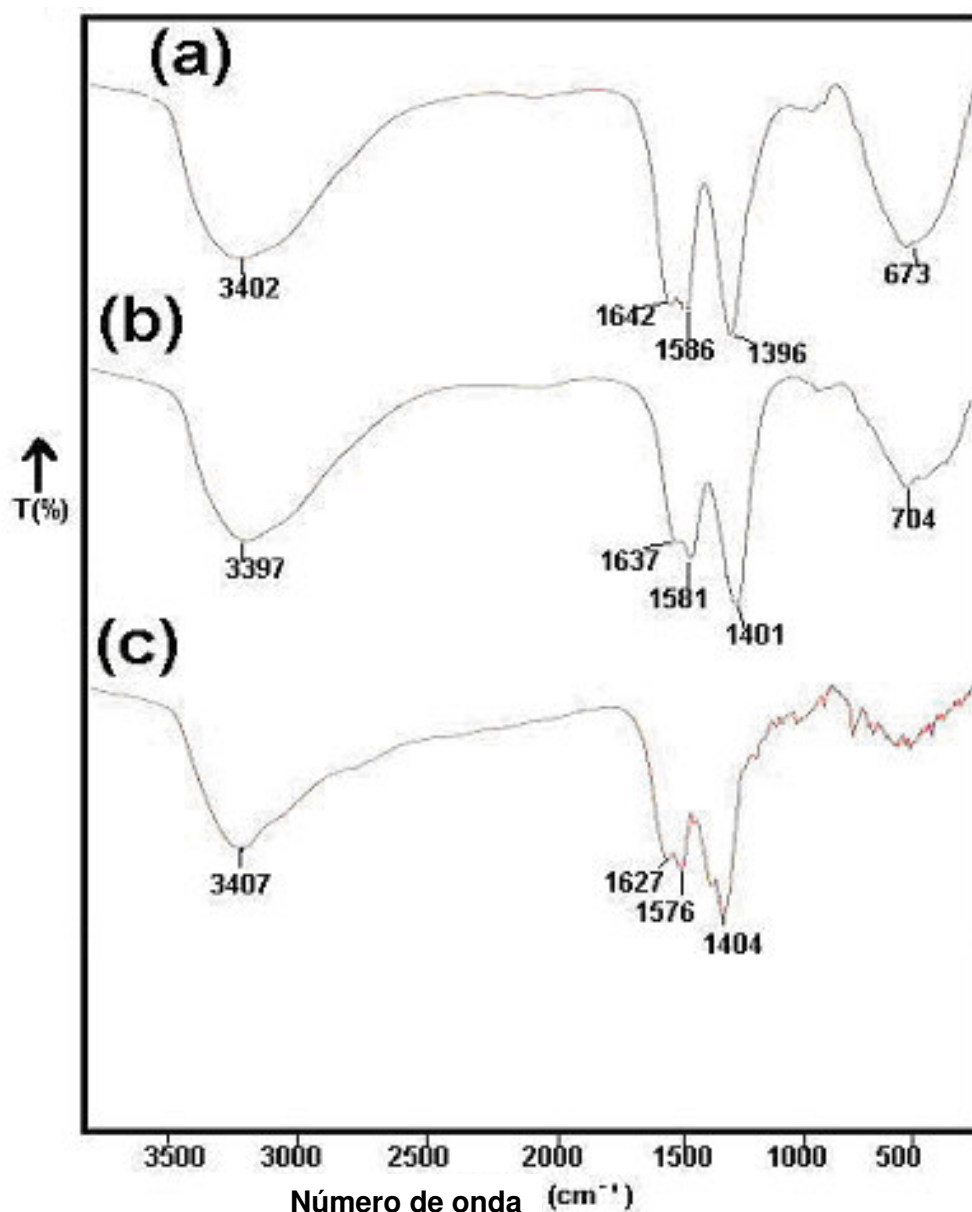


Figura 33 – Espectros de FTIR do AFRS complexado com os íons Cu (II) e Cd (II) em p[H] 10,0: **(a)** AF (puro), **(b)** AF/Cu (II) e **(c)** AF/Cd (II).

Na **Figura 30** até p[H] 3,5 houveram fracas interações eletrostáticas entre os íons metálicos e os grupos ligantes do AFRS. Como se pode ver na **Figura 31 (c)** o pico em 1719 cm^{-1} tem sua intensidade muito reduzida ao passo que o pico em 1396 cm^{-1} tem sua intensidade muito aumentada. Na **Figura 31 (a)**, observa-se o começo da ionização dos grupos COOH através do deslocamento do comprimento de onda da banda de 1720 cm^{-1} (quando estava em p[H] 3,5) para 1591 cm^{-1} (em p[H] 5,5); nota-se ainda o desaparecimento da banda em 1237

cm^{-1} e do aumento de intensidade da banda em 1386 cm^{-1} . Pode-se formular a hipótese do tipo de ligação que há entre os íons metálicos e os COO^- , de acordo com os valores observados para as bandas de estiramento assimétrico e simétrico, sugerindo a formação de quelatos que podem envolver dois grupos COOH adjacentes (ftalatos) ou um grupo carboxílico e um grupo fenol (salicílico). Boyd *et al.* (in: ADRIANO,D.C.)⁸² encontraram uma grande separação para os complexos de Cu(II) e Fe(III) com AH de solo, ou seja, encontraram o valor de 1720 cm^{-1} para a banda de estiramento de absorção de $\text{C}=\text{O}$ do AH e 1614 (para o complexo $\text{C}=\text{O}/\text{Cu}$) e 1625 cm^{-1} para a banda de estiramento assimétrico dos grupos COO^- (para o complexo $\text{C}=\text{O}/\text{Fe}$), isto pode sugerir que haja a formação de complexos metálicos unidentados. Tais observações foram confirmadas por Prasad *et al.* (in: ADRIANO,D.C.)⁸² para complexos de Fe(III) , Co(II) e Zn(II) com AF. Estes resultados também são consistentes com quelação metálica envolvendo ambos grupos COO^- adjacentes (tipo ftalato) ou um grupo COO^- e um fenólico adjacente (tipo salicílico), cada qual formando ligações simples com o íon metálico⁸². Piccolo e Stevenson⁸⁰ observaram o desaparecimento da pequena banda em 1855 cm^{-1} atribuída a anidridos cíclicos, em complexos metal : AH altamente carregados (razão > 1 para metal:AH) que confirmariam a formação de quelatos do tipo metal : ftalato. Quando são envolvidos OH de grupos fenólicos na complexação de metais separadamente ou em associação com grupos COO^- é esperada uma diminuição de intensidade e/ou um deslocamento da absorção do infravermelho próximo à 3440 cm^{-1} . Vários autores^{14,75,78,79,80} observaram um leve deslocamento nas bandas de OH (fenólicos) de 3500 a 3400 cm^{-1} em AH e AF, para 3300 a 3200 cm^{-1} em complexos com Zn(II) , Fe(III) , Cu(II) , Pb(II) e Mn(II) . Grupos fenólicos podem, desta forma, formar ligações covalentes com os íons metálicos. Banerjee e Mukherjee⁷⁸ determinaram que a extensão dos deslocamentos do estiramento OH através de frequências menores depende do tipo de metal e seguiu a seguinte ordem: $\text{Mn} (3383) < \text{Co} (3354) < \text{Cu} (3334) < \text{Fe} (3325)$, onde ocorreu um aumento inesperado para o $\text{Zn} (3442)$. No presente trabalho, conforme as **Figuras 30, 31, 32 e 33**, com aumento do pH observa-se que a frequência de onda das bandas de OH fenólicas diminuiu no caso dos íons Cd (II) , com exceção do Cu (II) que aumentou. A intensidade se manteve praticamente constante em todos os casos. Piccolo e Stevenson⁸⁰ mediram um aumento progressivo da

banda centrada em 3420 cm^{-1} e o aumento das quantidades de Cu(II) e Pb(II) adicionadas ao AF extraído de turfa. Este resultado junto com a resistência desta banda de infravermelho ao aquecimento à 100°C por 24 h, sugerem que parte desta absorção se deve à água de hidratação do complexo metálico. Prasad e Sinha ⁷⁹ observaram mudanças nas bandas em 1070 cm^{-1} sugerindo que estruturas de polissacarídeos possam também serem envolvidas na complexação com o metal. Alguns autores ^{14,75,80} atribuem as bandas de infravermelho muito intensas observadas na região de 1130 a 1080 cm^{-1} e em $\sim 890\text{ cm}^{-1}$ para AH e AF complexados com Cu(II), Zn(II), Al(III), Cd(II) ou Fe(III) à vibração metal-oxigênio de hidroxilatos e/ou íon metálico hidratado ligado à SH. Juste e Delas (In: ADRIANO, D.C.) ⁸² observaram bandas adicionais de infravermelho em comprimentos de onda mais baixos ($853, 817, 781, 697\text{ cm}^{-1}$) em complexos de Cu(II) -AH preparados com AH e Cu(II) em pH 7 que foram atribuídos à vibrações Cu(II)-OH. Neste trabalho, a intensidade da banda em torno de 1000 cm^{-1} aumentou em todos os espectros (**Figuras 30, 31, 32 e 33**). Stevenson e Go ⁸³ determinaram a absorção na região de 1660 a 1600 cm^{-1} em espectros de SH em parte a cetonas conjugadas. Apesar dos deslocamentos das frequências nesta região serem fortemente detectáveis devido à alta absorção. Piccolo e Stevenson ⁸⁰ observaram um deslocamento a frequências menores para a banda de 1610 cm^{-1} nos complexos de Cu(II) - AF, que é atribuído à vibração do grupo C=O em cetonas conjugadas diminuída pela ressonância entre $\text{C} - \text{O} - \text{Cu}$ e $\text{C} = \text{O} - \text{Cu}$ nos complexos. Espectros de infravermelho posteriores levaram à conclusão que estruturas cetônicas são as que são envolvidas primeiramente na complexação de metais com AF. A complexidade e heterogeneidade das SH é ainda causa de algumas ambigüidades e incertezas na interpretação do espectro de infravermelho de seus complexos metálicos. A espectroscopia de infravermelho pode fornecer informações úteis sobre a natureza e reatividade dos componentes das estruturas das SH que interagem com íons metálicos e nos arranjos moleculares dos sítios de ligação das SH envolvidas na complexação com o metal, como foi no caso do presente trabalho, onde pode-se formular a hipótese dos íons metálicos formarem ligações do tipo quelato com os ligantes do AFRS, havendo a participação de grupos fenólicos e carboxílicos.

3.9. Aplicação da espectroscopia de fluorescência ao estudo da complexação dos grupos funcionais do AFSR com os íons Cu (II), Zn (II) e Cd (II)

Na **Figura 34** tem-se os espectros de emissão de fluorescência do AFSR (20 mg L^{-1}), complexado com Cu (II), Zn (II) e Cd (II), em 4 pH diferentes, e na forma não-complexada (puro) (no espectro da **Figura 34(a)**) para efeitos de comparação com os complexados.

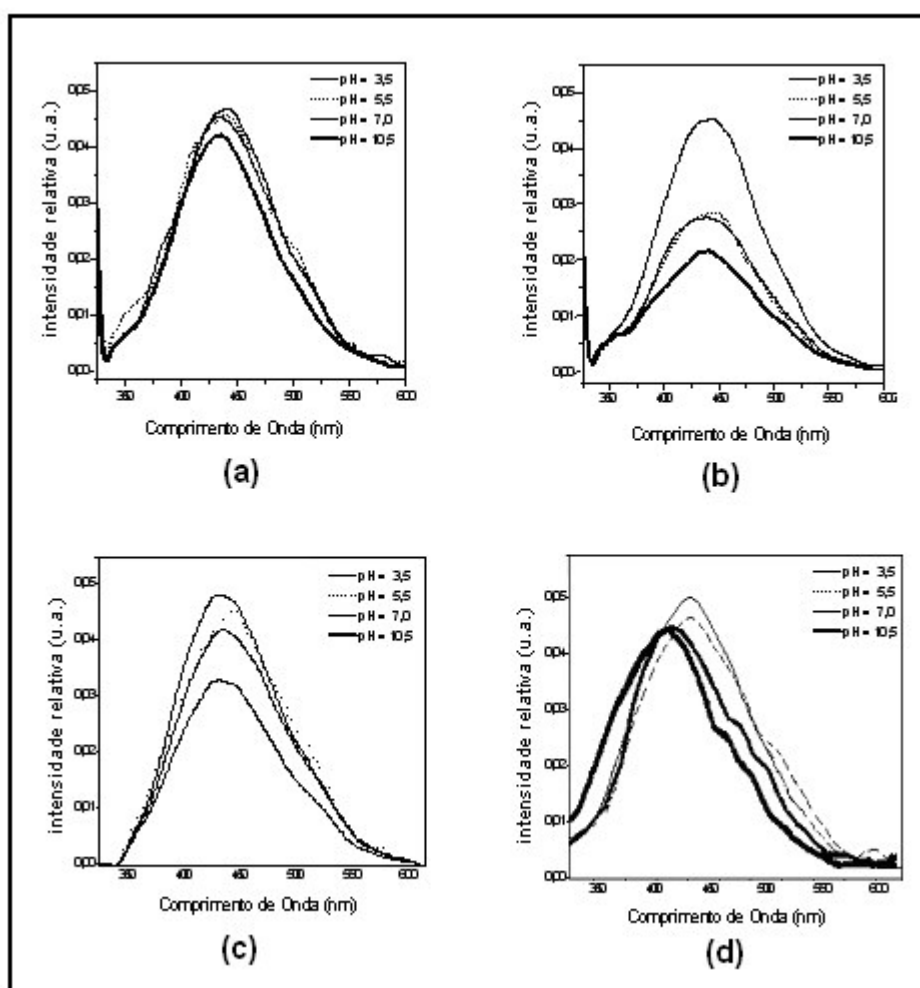


Figura 34 – Espectros de emissão de fluorescência do AFSR (20 mg L^{-1}) em 4 pH diferentes ($\lambda_{\text{ex}} = 313 \text{ nm}$). Em **(a)** AFSR, **(b)** AFSR + Cu(II) 0,005 mmols, **(c)** AFSR + Zn (II) 0,005 mmols, **(d)** AFSR + Cd (II) 0,005 mmols.

Na **Figura 34 (a)** observa-se os espectros de fluorescência do AFRS em 4 pH diferentes, apresentando todos como máximo de intensidade relativa o valor em torno de 435 nm que está na faixa de fluorescência de amostras de AF de água doce que vai de 410 a 490 nm ^{11,84}. Na **Figura 34 (b)** observa-se que em p[H] 5,5 deve haver a formação de complexos, pois a intensidade relativa da fluorescência diminui com o aumento do p[H] da solução, sugerindo a formação de espécies complexadas com o Cu (II). Até p[H] 7,0 supõe-se que estejam sendo formadas espécies do tipo ML, como ocorre nos diagramas de espécies da **Figura 26**. Em p[H] 10,5 a intensidade relativa da fluorescência diminui ainda mais provavelmente devido a formação da espécie ML₂ (conforme diagrama de espécies da **Figura 26**). Na **Figura 26 (c)** observa-se um pequeno abaixamento da intensidade relativa da fluorescência a partir de p[H] 10,5. Na **Figura 26 (d)** não houve abaixamento da intensidade relativa da fluorescência, como era de se esperar, segundo a literatura para o Cd (II) não existe abaixamento da fluorescência porque se trata de elemento diamagnético ⁸⁵. Em geral, íons metálicos, em especial íons paramagnéticos são capazes de provocar diminuição da fluorescência de ligantes orgânicos pelo aumento da taxa de alguns processos não radioativos que competem com a fluorescência, tais como cruzamentos intersistemas. Transições paramagnéticas de íons metálicos tais como Cu(II), Fe(III), Cr(III) ou VO(II), os quais possuem níveis d de energia mais baixa do que o estado singlete excitado, podem diminuir a intensidade de fluorescência de ligantes em SH via transferência de energia intramolecular ⁸⁶. Apesar do efeito da diminuição de intensidade para íons metálicos diamagnéticos ser teoricamente menos efetivo do que para íons paramagnéticos, os íons Pb(II) e Al(III) diminuem a fluorescência de SH, ao passo que Cd(II), o qual forma complexos em menor quantidade, não diminui a fluorescência ⁸⁵. Deslocamentos de comprimento de onda da emissão do máximo de fluorescência e/ou excitação dos picos também podem ser observados através de interações entre SH e íons metálicos paramagnéticos ⁸⁴. Isto sugere que alguns complexos fluorescentes metal-SH podem envolver a transição entre dois níveis de energia metálicos ou entre um nível de energia metálico e um nível π de energia no ligante, como por exemplo, uma transição de transferência de carga. Curvas de titulação de SH que tem sua fluorescência diminuída *versus* concentração de agente diminuidor adicionado (íon metálico) tem sido usadas para obter a capacidade complexante de SH

ligantes e as constantes de estabilidade do complexo metal-SH ⁸⁷. Adhikari e Hazra ⁸⁷ mediram um deslocamento através do comprimento de onda menor para picos de excitação de AF de solos na presença de Cu(II) ou Ni(II), ao passo que nenhum deslocamento no máximo de comprimento de onda foi observado por Almgren et al. ⁸⁸ para AF extraído de água do mar com Cu(II). Ghosh e Schnitzer ⁸⁹ mostraram que a posição e intensidade do pico de mais alto comprimento de onda (465 nm) de AF de solos é mantido constante mesmo que seja adicionado Cu(II) ou Fe(III), enquanto que a intensidade do pico de comprimento de onda mais baixo (360 nm) diminui e se desloca para comprimentos de onda maiores (390 nm) em aproximadamente pH 4 e 6. Ghosh e Schnitzer ⁸⁹ concluíram que estruturas aromáticas fluorescentes similares são envolvidas em complexação metálica de AF em condições naturais ou simulações de laboratório. Diversos pesquisadores observaram que a diminuição da fluorescência de AF e AH de diferentes fontes com vários íons metálicos, incluindo Cu(II), Pb(II), Ni(II) e Mn(II) , cresce com o aumento de pH ^{85,90,91}. Saar e Weber ⁸⁵ observaram que não há diminuição de fluorescência para o AF/Cu(II) até pH 2,1, e até pH 4 para Co(II), Ni(II) e Mn(II), para AF de solo e de água de rio na mesma razão íon metálico/AF. Em pH entre 6 e 7, o Cu(II) diminui a fluorescência do AF em aproximadamente 80%, o Co(II) é pelo menos 50% menos efetivo e o Mn(II) é aproximadamente 1/3 menos efetivo do que o Cu(II) ⁹⁰. Underdown *et al.* ⁹² são defensores da hipótese de um mecanismo de diminuição da fluorescência estático, dependendo a princípio da fração de sítios de ligantes de AF complexantes, e excluem a possibilidade de um mecanismo de diminuição da fluorescência dinâmico que possa ocorrer com a colisão de fluoróforos de AF com íons metálicos. O mecanismo dinâmico irá depender exclusivamente da concentração do íon causador da diminuição da fluorescência. Underdown *et al.* ⁹² observou também um aumento da fluorescência do AF com o aumento do pH acima do ponto de equivalência, o que indica que prótons são agentes diminuidores da fluorescência similares ao Cu(II) e Mn(II) e confirma que a diminuição da fluorescência não é colisional desde que a concentração de prótons livre seja pequena. Os metais Pb(II) e Mn(II) requerem uma concentração muito maior do que o Cu(II) para dar o mesmo grau de diminuição de fluorescência ^{85,92}. Isto confirma que deve haver uma forte associação íon metálico *versus* ligante para que haja a diminuição da fluorescência. Os íons metálicos Cu(II)

(paramagnético) e o Pb(II) (diamagnético) são mais efetivos do que os íons paramagnéticos Ni(II), Co(II) e Mn(II) para diminuir a fluorescência do AF, uma vez que o íon diamagnético Cd(II) não é capaz de diminuir a fluorescência do AF. Ryan e Weber⁹³ atribuíram a maior habilidade da diminuição da fluorescência do Cu(II) à sua capacidade de formar fortes complexos de esfera interna. Olson⁹¹ sugere que isto possa ocorrer para AH extraído de turfa especialmente em pH 10, onde o AH dissolvido seria relativamente flexível, ao passo que em pH 7 ligações de hidrogênio intra e intermoleculares intensas reduziriam o acesso do Cu(II) a certos sítios. Underdown *et al.*⁹² mostram que a maioria dos fortes grupos carboxílicos ácidos reagem primeiramente com o Cu(II), como ocorreria em sítios de quelação bidentados, tais como estruturas do tipo salicilatos ou ftalatos. Bartoli *et al.*⁹⁴ propuseram dois mecanismos para explicar a adsorção do Cu(II) por AF de solo em pH 3,5; 5 e 7 e várias razões Cu : AF. Uma reação protolítica (estritamente complexação), ocorrendo acima da razão Cu : AF de 0,6; e neutralização de carga da razão de Cu : AF de 0,6 a 1,1. Acima da razão 1 : 1, a constante de fluorescência sugere que o Cu(II) não seja mais absorvido pelo AF. Gregor *et al.*⁹⁵ mostraram pelo estudo da diminuição da fluorescência que nenhum ligante simples descreve adequadamente a complexação do Cu(II) e AF ao longo de toda a faixa de pH. Um modo misto de coordenação é proposto com os sítios dominantes variando com o pH e razão metal:ligante. Comparações de curvas de complexação metal - AF com as curvas para modelos de ligantes indicaram que os grupos potencialmente fluorescentes, tais como salicilatos ou ftalatos parecem estar diretamente envolvidos em complexação com o Cu(II) em baixos pH. Grupos aminoácidos aromáticos, tal como tirosina, fenilamina, citrato e malonato em AF podem ser importantes sítios de complexação para Cu(II) em pH de 3 a 7. Em pHs altos, cada quantidade polidentada fluorescente é diretamente envolvida na complexação, ou centros fluorescentes de complexação fracos se tornam envolvidos devido a sua proximidade a sítios doadores fortes, como por exemplo, contendo 1 a 2 átomos de carbono das partes complexantes⁸². Ryan *et al.*⁹⁰ mediram um aumento de espalhamento de luz muito pequeno durante a titulação do AF com Mn(II) e Co(II), ao passo que um grande aumento foi observado quando Cu(II) era adicionado, principalmente em pH maiores. Isto sugere que a coagulação induzida por cátions é menor para os cátions Mn(II) e Co(II) devido ao fato da sua associação com o AF ser fraca. Os experimentos de

espalhamento de luz feitos por Underdown *et al.*⁹² indicaram, contudo, que quase nenhuma agregação ocorre abaixo de 6 mmol de Cu(II) por grama de AF. Desta forma, a diminuição da fluorescência não está aparentemente relacionada à agregação. Íons metálicos diamagnéticos, tais como o Ca(II) podem competir com o Cu(II) promovendo uma diminuição no efeito da fluorescência, ao passo que íons paramagnéticos que não complexam com a SH não podem diminuir a fluorescência. Na maioria dos casos, as capacidades de complexação média determinadas por diminuição da fluorescência foram da mesma ordem de magnitude daquelas determinadas por titulação polarográfica. O método da diminuição da fluorescência tem sido usado também para o estudo da complexação de metais por SH não fracionadas que se encontram em águas naturais não tratadas. Ryan e Weber⁹⁶ observaram que o Cu(II) pode complexar SH dissolvidas em águas naturais e águas marinhas provavelmente pela troca de íons metálicos fracamente ligados, tais como o Zn(II), Cd(II), Ca(II) e Mg(II). Íons mais fortemente ligados, tais como o Al(III), Fe(III) e Pb(II) parecem competir satisfatoriamente com o Cu(II) pelos sítios, a menos que o Cu(II) esteja presente em grandes quantidades⁹⁶. Tuschall e Brezonik (in: ADRIANO, D.C.)⁸² confirmaram que o Cu(II) é mais efetivo do que os íons divalentes Cd(II) e Zn(II) na complexação de SH dissolvidas em águas de lagos. Os baixos valores medidos em todos os casos para os máximos de diminuição de intensidade de fluorescência sugerem que nem todos os fluoróforos das SH são envolvidos na complexação com o Cu(II). Um resultado semelhante obtido para AF extraído da decomposição de folhas sugere baixa interação entre os sítios de complexação dos metais e as unidades fluorescentes nestes materiais⁹⁷. Foi observada contudo uma discrepância entre a capacidade de complexação medida por fluorescência e por voltametria anódica diferencial de pulso. Isto pode ser explicado devido a presença de ligantes orgânicos não fluorescentes ou a reações de troca de Cu(II) adicionado com metais fracamente complexados, por isso produzem baixa diminuição da fluorescência⁹⁸. Em resumo, a espectroscopia de fluorescência tem algumas vantagens em relação a outras técnicas em solução, como por exemplo: as medidas são relativamente rápidas, não há a necessidade de separação entre os metais livres e complexados, evitando erros que podem ocorrer com a separação das espécies. Nesta técnica não é necessário o uso de tampões, nem de agentes absorventes. O método é muito

mais sensível do que voltametria diferencial de pulso por exemplo. Porém, a principal desvantagem da fluorescência é que ela é muito mais eficiente para metais paramagnéticos, tal como o Cu(II), como foi observado neste trabalho.

CONCLUSÕES

- Na primeira etapa, foram determinadas as quantidades dos grupos funcionais oxigenados (carboxílicos e fenólicos) utilizando o método matemático de Gran modificado e feita a comparação dos resultados com o BEST7 e com os valores teóricos. Os valores obtidos por BEST7 foram mais próximos dos valores teóricos do que os valores obtidos pelo método matemático de Gran modificado.
- Foram determinados os valores das constantes de complexação dos íons Cu (II), Zn (II) e Cd (II) com os grupos funcionais da mistura modelo, através de titulações potenciométricas, sendo interpretados os resultados com os programas BEST7 e SPE, e comparados com os valores da literatura, indicando uma boa reprodutibilidade da metodologia empregada. O íon Cu (II) coordenou com todos os grupos funcionais da mistura modelo, formando apenas espécies do tipo ML e ML₂. Os íons Zn (II) e Cd (II) apresentaram baixos valores de logK bem como pequena quantidade de espécies formadas. Acima de pH 7 também foram observadas espécies hidróxidas do tipo MOHL, para os íons Cd (II) e Zn (II).
- Os resultados obtidos pela técnica de espectroscopia de luz UV-Vis comprovaram as espécies encontradas nos diagramas de espécie obtidos por potenciometria da mistura modelo com o Cu (II).
- Na segunda etapa deste trabalho foi aplicada ao AFRS a metodologia desenvolvida na primeira etapa. Titulou-se o AFRS e determinou-se a quantidade dos seus grupos carboxílicos e fenólicos (meq g⁻¹) pelo método de Schnitzer e Gupta e titulação potenciométrica com auxílio do programa BEST7. Com os dados obtidos por BEST7 dividimos os valores encontrados para os grupos carboxílicos e fenólicos em 5 grupos: fenólicos, benzóicos, catecóis, ftálicos e salicílicos.
- Através da potenciometria foram calculados os valores das constantes de dissociação de prótons de cada um dos 5 grupos ácidos do AFRS e seus valores obtidos foram muito próximos aos da literatura.
- O grupo funcional que mais formou complexos com os íons bivalentes foi o catecol, pois complexou com todos os íons estudados neste trabalho, e em maior quantidade com os íons Cu (II). De acordo com os resultados

obtidos por potenciometria pode-se fazer a seguinte série de reatividade para os íons divalentes e o AFRS: Cu (II) >> Cd (II) > Zn (II).

- Foi observado por FTIR que até pH 3,5 houveram fracas interações eletrostáticas entre os íons metálicos estudados e os grupos ligantes do AFRS. O começo da ionização dos grupos COOH é observado a partir de pH 5,5 através do deslocamento do comprimento de onda da banda de 1720 cm^{-1} (quando estava em pH 3,5) para 1591 cm^{-1} (em pH 5,5). Podendo-se sugerir a formação de quelatos formados entre dois grupos COOH adjacentes (tipo ftalato) ou um grupo COOH e um OH fenólico adjacente (tipo salicilato), cada qual formando ligações simples com os íons metálicos. Foi observado que a frequência de onda das bandas de OH fenólicos diminuiu no caso dos íons Cd (II), com exceção do Cu (II) que aumentou. A intensidade se manteve praticamente constante em todos os casos. A intensidade das bandas em torno de 1000 cm^{-1} atribuída às interações de íons metálicos com grupos OH aumentou em cada faixa de pH.
- Através dos espectros de fluorescência observou-se a formação de complexos com os íons Cu (II) a partir de pH 5,5 devido a diminuição da intensidade relativa da fluorescência. Até pH 7,0 supõe-se que foram formadas espécies do tipo ML. Em pH 10,5 a intensidade relativa da fluorescência diminuiu ainda mais devido à formação de espécies ML_2 .

TRABALHOS FUTUROS

- Aplicar a metodologia desenvolvida para o estudo da complexação da mistura modelo com os íons trivalentes: Al (III) e Fe (III).
- Aplicar a metodologia desenvolvida para o estudo da complexação de outras substâncias húmicas da IHSS com os íons trivalentes: Al (III) e Fe (III).

REFERENCIAS

- 1–RAUEN, T.G. Ácidos húmicos como agentes tensoativos e sua influência na solubilização de compostos apolares em solução aquosa. Florianópolis, SC, p.1, Dissertação (Mestrado) – Química, UFSC (Florianópolis), 2001
- 2–STEVENSON, F.J. Humus Chemistry (Genesis, Composition, Reactions), 2nd ed.; New York, Ed. John Wiley and Sons, p.189, 1994
- 3–MARTINS, A.O. Extração e caracterização química e morfológica de substâncias húmicas da lagoa do Peri. Florianópolis, SC, p.3, monografia (estágio do curso de graduação) – Química, UFSC (Florianópolis), 1999
- 4–ROCHA, J.C.; ROSA, A. H. Substâncias Húmicas Aquáticas: Interação com espécies metálicas. São Paulo, Ed.UNESP, p.27, 2003
- 5–ROCHA, J.C.; ROSA, A. H. Substâncias Húmicas Aquáticas: Interação com espécies metálicas. São Paulo, Ed.UNESP, p.29, 2003
- 6–ROCHA, J.C.; ROSA, A. H. Substâncias Húmicas Aquáticas: Interação com espécies metálicas. São Paulo, Ed.UNESP, p.25, 2003
- 7–ROCHA, J.C.; ROSA, A. H. Substâncias Húmicas Aquáticas: Interação com espécies metálicas. São Paulo, Ed.UNESP, p.19, 2003
- 8–ROCHA, J.C.; ROSA, A. H. Substâncias Húmicas Aquáticas: Interação com espécies metálicas. São Paulo, Ed.UNESP, p.41, 2003
- 9–MUSSAK, E. Em nosso devido lugar (ensaio), Super Interessante, Especial: Ecologia (Como salvar a Terra), p.14, junho/2001
- 10–KARINI, A.A.; SINGER, P.C. Trialomethane formation in open reservoirs. Journal of American Water Works, v.83, p.84-88, 1991
- 11–SENESI, N.; MIANO, T.M.; PROVENZANO, M.R.; BRUNETTI, G. Spectroscopic and compositional comparative characterization of I.H.S.S. reference and standard fulvic and humic acids of various origin. The science of the Total Environment, v. 81/82, p.143-156, 1989
- 12–LOBARTINI, J.C. The geochemical nature and agricultural importance of commercial humic matter. The Science of the Total Environment, v.113, p.1-15, 1992
- 13–KORDEL, W. The importance of natural organic material for environmental process in waters and soils. Pure and Applied Chemistry, v.69, p.1571-1600, 1997
- 14–SENESI, N.; SPOSITO, G.; MARTIN, J.P. Copper(II) and Iron(III) complexation by soil humic acids: An IR and ESR study. The Science Total Environment, v. 55, p.351-362, 1986
- 15–ROCHA, J.C.; ROSA, A. H. Substâncias Húmicas Aquáticas: Interação com espécies metálicas. São Paulo, Ed.UNESP, p.39, 2003

- 16–ROCHA, J.C.; ROSA, A. H. Substâncias Húmicas Aquáticas: Interação com espécies metálicas. São Paulo, Ed.UNESP, p.34, 2003
- 17–CHEN, J.; GU, B.; LE BOEUF, E.J.; PAN, H.; DAI, S. Spectroscopic characterization of the structural and functional properties of natural organic matter fractions. *Chemosphere*, v.48, p.59-68, 2002
- 18–STEVENSON, F.J. Humus Chemistry (Genesis, Composition, Reactions), 2nd ed.; New York, Ed. John Wiley and Sons, p.230, 1994
- 19–ROCHA, J.C.; ROSA, A. H. Substâncias Húmicas Aquáticas: Interação com espécies metálicas. São Paulo, Ed.UNESP, p.43, 2003
- 20–ROCHA, J.C.; ROSA, A. H. Substâncias Húmicas Aquáticas: Interação com espécies metálicas. São Paulo, Ed.UNESP, p.44, 2003
- 21–PRESTON, C. M. Characterization and transformations of organic matter and humic substances detected by NMR of ^1H , ^{13}C , ^{15}N and ^{31}P . In: *Anais*, 2^o Encontro Brasileiro sobre Substâncias Húmicas, Embrapa -São Carlos/SP, p.26-31, 1997
- 22–STEVENSON, F.J. Humus Chemistry (Genesis, Composition, Reactions), 2nd ed.; New York, Ed. John Wiley and Sons, p.291, 1994
- 23–ELKINS, K.M.; NELSON, D.J. Spectroscopic approaches to the study of the interaction of aluminum with humic substances. *Coordination Chemistry Reviews*, v.228, p.205-225, 2002
- 24–KILOPS, S.D.; KILOPS, V. J. Organic Geochemistry, New York, Ed. John Wiley and Sons, p.95-106, 1993
- 25–ROCHA, J.C.; ROSA, A. H. Substâncias Húmicas Aquáticas: Interação com espécies metálicas. São Paulo, Ed.UNESP, p.70, 2003
- 26–BIRKETT, J.W.; JONES, M.N.; BRYAN, N.D. The effects of solution conditions on partial specific volumes of humic substances. *Analytica Chimica Acta*, v. 362, n.2-3, p.299-308, 1998
- 27–WERSHAW, R.L. Model for humus in Soils and Sediments, *Environmental Science Technology*, v.27, p. 814-816, 1993.
- 28–ROCHA, J.C.; ROSA, A. H. Substâncias Húmicas Aquáticas: Interação com espécies metálicas. São Paulo, Ed. UNESP, p.33, 2003
- 29–BAALOUSHA, M.; MOTELICA-HEINO, M.; Le COUSTUMER, P. Conformation and size of humic substances: Effects of major cation concentration and type, pH, salinity, and residence time. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, v.272, p.48-55, 2006
- 30–CALACE, N.; CARDELLICCHIO, N.; PETRONIO, B.M.; PIETRANTONIO, M.; PIETROLETT, M. *Marine Environmental Research*, v. 61, p.40–58, 2006.

- 31–ALVAREZ-PUEBLA, R.A.; VALENZUELA-CALAHORRO, C.; GARRIDO, J.J. Theoretical study on fulvic acid structure, conformation and aggregation: A molecular modelling approach. *Science of The Total Environment*, v.358, p. 243-254, 2006.
- 32–LU, X.Q.; JOHNSON, W.D. The reaction of aquatic humic substances with copper (II) ions: an ESR study of complexation. *The Science of the Total Environment*, v.203, p.199-207, 1997
- 33–SIERRA, M.M.S.; AREND, K.; FERNANDES, A.N.; GIOVANELA, M.; SZPOGANICZ, B. Application of potentiometry to characterize acid and basic sites in humic substances. Testing the BEST 7 program with a weak-acid mixture. *Analytica Chimica Acta*, v.445, p.89-98, 2001
- 34–SPOKES, L.J.; LISS, P.S. Photochemically induced redox reactions in seawater. I. Cations. *Marine Chemistry*, v.49, p.201-213, 1995
- 35–ASTER, B.; VON BOHLEN, A.; BURBA, P. Determination of metals and their species in aquatic humic substances by using total-reflection X-ray fluorescence spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B*, v.52, p.1009-1018, 1997
- 36–SARGENTINI, Jr. E.; ROCHA, J.C.; ROSA, A.H.; ZARA, L.F.; DOS SANTOS, A. Substâncias Húmicas Aquáticas: Fracionamento molecular e caracterização de rearranjos internos após complexação com íons metálicos. *Química Nova*, v.24, n.3, p.339-344, 2001
- 37–MARTELL, A. The Design and Synthesis of Chelating Agents. In: *Development of Iron Chelators for Clinical Use*; Elsevier North Holland, Inc, p.68-69, 1981
- 38–STEVENSON, F.J. *Humus Chemistry (Genesis, Composition, Reactions)*, 2nd ed.; New York, Ed. John Wiley and Sons, p.394-395, 1994
- 39–SCORZELLI, I.B.; FRAGOMENI, A.L.; TOREM, M.L. Encontro Nacional de Tratamento de Minérios e Metalurgia Extrativa, São Pedro, SP, 1998
- 40–LORENZO, J.I.; NIETO, O.; BEIRAS, R. Effect of humic acids on speciation and toxicity of copper to *Paracentrotus lividus larvae* in seawater. *Aquatic Toxicology*, 58, p. 27-41, 2002
- 41–GIACOMELLI, M.B.O.; LIMA, M.C.; BORTOLUZZI, I.P.; KLUG, M.; STÜPP, V. Determinação de Metais Pesados em Sedimento do Rio Tubarão, SC. *Engenharia Sanitária Ambiental*, v.5, n.3 e 4, p.178-184, 2000
- 42–HANSTEN, C.; HEINO, M.; PYNNÖNEN, K. Viability of *glochidia* of *Anodonta anatina* (*Unionidae*) exposed to selected metals and chelating agents. *Aquatic Toxicology*, v.34, p.1-12, 1996
- 43–MOORE, J.N. Contaminant Mobilization Resulting from Redox Pumping in a Metal Contaminated River-Reservoir System. In: *Environmental Chemistry of Lakes and Reservoirs*. Washington, DC, American Chemical Society, p. 453 e 489, 1994

- 44–SCHWARTZENBACH, G.; FLASCHKA, H., Complexometric titrations. London, Ed. Methuen & Co. LTDA, p.256, 1969
- 45–INTERNET: SUWANNEE river. Disponível em:
<<http://www.floridastateparks.org/wilderness/info.cfm> >
- 46–INTERNET: SUWANNEE river. Disponível em:
<<http://www.srwmd.state.fl.us>>
- 47–LEENHEER, J.A.; WERSHAW, R.L.; REDDY, M.M. Strong-acid carboxyl-group structures in fulvic acid from the Suwannee River, Georgia. 1.Minor Structures. Environmental Science Technology, v.29, p.393-398, 1995
- 48–WOOLARD, C.D.; LINDER, P.W. Modelling of the cation binding properties of fulvic acids: an extension of the RANDOM algorithm to include nitrogen and sulphur donor sites. The Science of the Total Environment, v.226, p.35-46, 1999
- 49–MARTELL, A. E.; MOTEKAITIS, R.J. Determination and Use of Stability Constants, Ed. VCH Publishers, New York, 1992
- 50–ALEIXO, L.M.; GODINHO, O.E.S.; COSTA, W.F. Potentiometric study of acid-base properties of humic acid using linear functions for treatment of titration data. Analytica Chimica Acta, 257, p.35-39, 1992
- 51–GAMBLE, D.S. Potentiometric Titration of Fulvic Acid: Equivalent Point Calculations and Acidic Functional Groups. Canadian Journal of Chemistry, v.50, p.2680-2690, 1972
- 52–AREND, K. Determinação dos grupos funcionais e estudo das características de complexação de compostos húmicos sedimentares por métodos químicos e potenciométricos. Florianópolis, SC, p.46-50, Dissertação (Mestrado) – Química – UFSC, 1999
- 53–EPHRAIM, J.H.; BORÉN, H.; ARSENIE, I.; PETTERSSON, C.; ALLARD, B. A combination of acid-base titrations and derivatization for functional group determinations of an aquatic fulvic acid. The Science of the Total Environment, v.81/82, p.615-624, 1989
- 54–SIERRA, M.M.D.; FERNANDES, A.N.; SZPOGANICZ, B. Influence of amide linkages on acidity determinations of humic substances. Talanta, v.62, p.687-693, 2004
- 55–MASINI, J.C.; ABATE, G.; LIMA, E.C.; HANN, L.C.; NAKAMURA, M.S.; LICHTIG, J.; NAGATOMY, H.R. Comparison of methodologies for determination of carboxylic and phenolic groups in humic acids. Analytica Chimica Acta, v.364, p.223-233, 1998

- 56–GUIOTOKU, M. Estudo dos equilíbrios de monossacarídeos com os íons vanadila (IV) e zinco (II) em solução aquosa. Florianópolis, SC, p.20, Dissertação (Mestrado) – Química – UFSC, 2002
- 57–BAKER, L. A. Environmental Chemistry of Lakes and Reservoirs. Washington, DC., Ed. American Chemical Society, p. 199, 1994
- 58–ELKINS, K.M.; NELSON, D.J. Spectroscopic approaches to the study of the interaction of aluminum with humic substances. Coordination Chemistry Reviews, v.228, p.205-225, 2002
- 59–NIFANT'EVA, T.I.; SHKINEV, V.M.; SPIVAKOV, B.Ya.; BURBA, P. Membrane filtration studies of aquatic humic substances and their metal species: a concise overview. Part 2: Evaluation of conditional stability constants by using ultrafiltration. Talanta, v.48, p.257-267, 1999
- 60–KISS, T.; KOZLOWSKI, H.; MICERA, G.; ERRE, L.S. Cupric ion binding by dihydroxybenzoic acids. Polyhedron, v.8, n.5, p.647-651, 1989
- 61–MARTELL, A.E.; SMITH, R.M. In: Critical Stability Constants (Encyclopedia); v.1,2, e 3, Plenum Press, Ed.; New York. 1982
- 62–GEREGA, K.; KOZLOWSKI, H.; KISS, T.; MICERA, G.; ERRE, L.S.; CARIATI, F. Cupric complexes with 3,4-dihydroxybenzoic acid. Inorganica Chimica Acta, v.138, p.31-34, 1987
- 63–MICERA, G.; ERRE, L.S.; CARIATI, F.; CIANI, G.; SIRONI, A. Interaction of metal- ions with humic-like models. Part 8th: Mn(II), Co(II), Ni(II), Cu(II) and Zn(II). Complexes of 2,4-dihydroxybenzoic acid. Inorganica Chimica Acta, v. 108, p.L1-L2, 1985
- 64–STEVENSON, F.J. Humus Chemistry (Genesis, Composition, Reactions), 2nd ed.; New York, Ed. John Wiley and Sons, p.380, 1994
- 65–BAES Jr., C.F.; MESMER, R.E. The hydrolysis of cations. New York, Ed. John Wiley & sons, Inc., p.267-274, 1976
- 66–STEVENSON, F.J. Humus Chemistry (Genesis, Composition, Reactions), 2nd ed.; New York, Ed. John Wiley and Sons, p.226, 1994
- 67–SUTHEIMER, S.H.; FERRACO, M.J.; CABANISS, S.E. Molecular size effects on carboxyl acidity: implications for humic substances. Analytica Chimica Acta, v.304, p.187-194, 1995
- 68–LEENHEER, J.A.; WERSHAW, R.L.; BROWN, G.K.; REDDY, M.M. Characterization and diagenesis of strong-acid carboxyl groups in humic substances. Applied Geochemistry, v.18, n.3, p.471 - 482, 2003
- 69–SENESE, N. Methods of soil analysis. Part 3. Chemical Methods-SSSA Book Series n.5, Chapter 11: Eletron spin (or Paramagnetic Resonance Spectroscopy, Madison, Ed. Soil Science Society of America and American Society of Agronomy, p.323-356, 1996

- 70–SENESI, N.; SENESI, G.S. Encyclopedia of Soils in the Environment, Chapter: Electron-spin resonance spectroscopy, Ed.Elsevier, p.426-437, 2005
- 71–SENESI, N.; CHESHIRE, M.V. Structure and surface reactions of soil particles, Chapter 9: Electron Spin Resonance Spectroscopy of Organic and Mineral Soil Particles, Ed.John Wiley & sons Ltd, p.327-367, 1998
- 72–SENESI, N.; SPOSITO, G. Residual copper (II) complexes in purified soil and sewage sludge fulvic acids: An electron spin study. Soil Science Society American Journal, v.48, p.1247-1253, 1984
- 73–ABDUL-HALIM, A.L.; EVANS, J.C.; ROWLANDS, C.C.; THOMAS, J.H. An EPR spectroscopic examination of heavy metals in humic and fulvic soil fractions. Geochimica Cosmochimica Acta, v.45, p.481-487, 1981
- 74–BOYD, S.A.; SOMMERS, D.E.; NELSON, D.W.; WEST, D.W. Copper(II) binding by humic acid extracted from sewage sludge: An electron spin resonance study. Soil Science Society American Journal, v.47, p.43-46, 1983
- 75–SENESI, N.; SPOSITO, G.; MARTIN, J.P. Copper(II) and iron (III) complexation by humic acid-like polymers (melanins) from soil fungi. The Science of the Total Environment, v.62, p.241-252, 1987
- 76–BRESNAHAN, W.T.; GRANT, C.L.; WEBER, J.H. Stability constants for the complexation of copper(II) ions with water and fulvic acids measured by an ion selective electrode, Analytical Chemistry, v.50, p.1675-1679, 1978
- 77–BROWN, G.K.; CANABISS, S.E.; MacCARTHY, P.; LEENHEER, J.A. Cu(II) binding by a pH-fractionated fulvic acid. Analytica Chimica Acta, v.402, p.183-193, 1999
- 78–BANERJEE, S.K.; MUKHERJEE, S.K. Studies of infrared spectra of some divalent transitional metal humates. Journal Indian Society Soil Science, v.20, p.91-94, 1972
- 79–PRASAD, B.; SINHA, M.K. Physical and chemical characterization of molecularly homogeneous fulvic acid fractions and their metal complexes. Journal Indian Society Soil Science, v.31, p.187-191, 1983
- 80–PICCOLO, A.; STEVENSON, F.J. Infrared spectra of Cu^{2+} , Pb^{2+} , Ca^{2+} complexes of soil humic substances. Geoderma, v.27, p.195-208, 1982
- 81–VINKLER, P.; LAKATOS, B.; MEISEL, J. Infrared spectroscopic investigations of humic substances and their metal complexes. Geoderma, v.15, p.231-242, 1976
- 82–ADRIANO, D.C. Biogeochemistry of trace metals. Ed.Lewis Publishers, Florida, p.461-462, 1992

- 83–STEVENSON, F.J.; GOH, K.M. Infrared spectra of humic acids and related substances. *Geochimica Cosmochimica Acta*, v.35, p.471-483, 1971
- 84–SENESE, N. Molecular and quantitative aspects of the chemistry of fulvic acid and its interactions with metal ions and organic chemicals. *Analytica Chimica Acta*, v.232, p.77-106, 1990
- 85–SAAR, R.A.; WEBER, J.H. Comparison of spectrofluorimetry and ion-selective electrode potentiometry for determination of complexes between fulvic acid and heavy-metal ions. *Analytical Chemistry*, v.52, p.2095-2100, 1980
- 86–SEITZ, W.R. Fluorescence methods for studying speciation of pollutants in water. *Trends in Analytical Chemistry I*, v.16, p.79-83, 1981
- 87–ADHIKARI, M.; HAZRA, G.G. Humus-metal complex: spectra studies. *Journal Indian Chemistry Society*, v.53, p.513-516, 1976
- 88–ALMGREN, T.; JOSEFSON, B.; NYQUIST, G. A fluorescence method for studies of spent sulfite liquor and humic substances in sea water. *Analytica Chimica Acta*, v.78, p.411-422, 1975
- 89–GHOSH, K.; SCHNITZER, M. Fluorescence excitation spectra and viscosity behavior of a fulvic acid and its copper and iron complexes. *Soil Science Society American Journal*, v.45, p.25-29, 1981
- 90–RYAN, D.K.; THOMPSON, C.P.; WEBER, J.H. Comparison of Mn^{2+} , Co^{2+} , and Cu^{2+} binding to fulvic acid as measured by fluorescence quenching. *Canadian Journal Chemistry*, v.64, p.1505-1509, 1983
- 91–OLSON, B.M. The use of fluorescence spectroscopy to study herbicide-humic acid interactions: preliminary observations. *Canadian Journal Soil Science*, v.70, p.515-518, 1990
- 92–UNDERDOWN, A.W.; LANGFORD, C.H.; GAMBLE, D.S. The fluorescence and visible absorbance of $Cu(II)$ and $Mn(II)$ complexes of fulvic acid: the effect of metal ion loading. *Canadian Journal Soil Science*, v.61, p.469-474, 1981
- 93–RYAN, D.K.; WEBER, J.H. Fluorescence quenching titration for determination of complexing capacities and stability constants of fulvic acid. *Analytical Chemistry*, v.54, p.986-990, 1982
- 94–BARTOLI, F.; HATIRA, A.; ANDRE, J.C. PORTAL, J.M. Proprietes fluorescentes et colloïdales d'une solution organique de podzol au cours du processus de complexation par le cuivre. *Soil Biological Biochemistry*, v.19, p.355-362, 1987
- 95–GREGOR, J.E.; POWELL, H.K.J.; TOWN, R.M. Evidence for aliphatic mixed mode coordination in copper(II)-fulvic acid complexes. *Journal Soil Science*, v.40, p.662-673, 1989

- 96–RYAN, D.K.; WEBER, J.H. Copper(II) complexing capacities of natural waters by fluorescence quenching. *Environmental Science Technology*, v.16, p.866-872, 1982
- 97–FRIMMEL, F.H.; BAUER, H. Influence of photochemical reactions on the optical properties of aquatic humic substances gained from fall leaves. *The Science of the Total Environment*, v.62, p.139-148, 1987
- 98–BOUSSEMART, M.; BENAMOU, C.; RICHOU, M.; BENAÏM, J.Y. Comparison of differential pulse anodic stripping voltammetry and spectrofluorimetry for determination of complexes between copper and organic matter in interstitial waters extracted from marine sediments. *Marine Chemistry*, v.28, p.27-39, 1989